

Feinstrukturelle und physiologische Untersuchungen zur Steuerung von Entwicklung und Differenzierung der Sphärosomen und Microbodies in eukaryontischen Pflanzenzellen

Gerhard Wanner

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0028

Feinstrukturelle und physiologische Untersuchungen
zur Steuerung von Entwicklung und Differenzierung
der Sphärosomen und Microbodies in eukaryontischen
Pflanzenzellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von:
Gerhard Wanner
aus München

Dezember 1977



1. Berichterstatter: Prof.Dr.R.R.Theimer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Schötz

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.1978

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

CHX	=	Cycloheximid
CM	=	Cytoplasmamembran
CP	=	Cytoplasma
CW	=	Zellwand
DAB	=	Diaminobenzidinhydrochlorid
ER	=	endoplasmatisches Retikulum
Ki	=	Kinetin
M	=	Mitochondrium
Mb	=	Microbody
Mb a	=	Microbody Typ a
Mb b	=	Microbody Typ b
N	=	Zellkern
Pl	=	Plasmalemma
PP	=	Palisadenparenchym
Rb	=	Ribosomen
SP	=	Schwammparenchym
Sph	=	Sphärosom
TP	=	Tonoplast
V	=	Vakuole

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	9
1. Anzuchtmethoden	9
1.1. Anzucht des Pflanzenmaterials	9
1.2. Anzucht der Neurospora crassa "slime"	
Mutante	9
2. Behandlung der Keimlinge mit Cycloheximid	
oder Kinetin	12
3. Trennung der Kotyledonen von Wassermelonen-	
keimlingen in Schwamm- und Palisadenparenchym	12
4. Aufschluß und Zellfraktionierung	12
4.1. Kotyledonen	12
4.2. Zellen der Neurospora crassa "slime" Mutante	13
5. Bestimmung der Enzymaktivitäten	15
5.1. Cytochrom-c-Oxidase	15
5.2. NADH ₂ -Cytochrom-c-Reduktase	15
5.3. Glykolatoxidase	16
5.4. Isocitratlyase.....	16
5.5. Katalase	16
5.6. Malatsynthetase	17
5.7. Peroxidase	17
5.7.1. Benzidintest nach Gregory (1966)	17
5.7.2. Guajakoltest nach George (1953)	18
6. Bestimmung des Proteingehaltes und der Ge-	
samtlipide	18
7. Präparation des Pflanzenmaterials für die	
Elektronenmikroskopie	18
7.1. Kotyledonen von Sonnenblumen-, Raps- und	
Wassermelonenkeimlingen	18
7.2. Zellen der Neurospora crassa "slime" Mutante	19

7.3.	Präparation der Microsomalfraktion der Nicotiana glauca Zellen für die Elektronenmikroskopie	20
7.4.	Einbettung	20
7.5.	Herstellung der Ultradünnschnitte	21
7.5.1.	Schneiden der Proben	21
7.5.2.	Nachkontrastierung der Schnitte	22
7.6.	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Schnitte	22
8.	Anfertigung der lichtmikroskopischen Präparate	22
9.	Cytochemischer Nachweis der katalasehaltigen Strukturen in den Gewebestückchen	23
10.	Anfertigung des dreidimensionalen Microbody-Modelles	23
11.	Projektionsmodell der Mitochondrien	23
C.	<u>Ergebnisse</u>	25
I.	Differenzierung fett-speichernder Kotyledonengewebe in photosynthetisch aktives Mesophyll	25
1.	Mobilisierung der Reservefette	25
2.	Änderung der Funktion der Microbodies von Glyoxysomen in Blattperoxisomen	28
2.1.	Änderung der Enzymaktivitäten der Microbodies in Kotyledonen von Wassermelonenkeimlingen	28
2.2.	Änderungen in Größe und Gestalt der Microbody-Profile in den Kotyledonen von Wassermelonenkeimlingen	35
2.3.	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Microbody-Population in Kotyledonen von Sonnenblumenkeimlingen...	41
2.4.	Feinstrukturelle Untersuchungen zum Mechanismus der Funktionsänderung der Microbodies	45

II.	Differenzierung der Zellen der Neuro- spora crassa "slime" Mutante	48
1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Entwicklung einer Zellkultur von Neuro- spora crassa "slime"	48
2.2.	Ultrastrukturelle Veränderungen	49
2.1.	Kerne	49
2.2.	Mitochondrien	49
2.3.	Endoplasmatisches Retikulum und Sphäro- somen	52
2.3.1.	Reduktion des ER	52
2.3.2.	Zunahme der Zahl der Sphärosomen	54
2.4.	Microbodies	55
2.4.1.	Cytochemischer Nachweis zweier Microbody- Typen	55
2.4.2.	Eigenschaften und Regulation der beiden Microbody-Typen	57
2.4.2.1.	Microbody-Typ a	57
2.4.2.2.	Microbody-Typ b	57
2.5.	Verbindungen der Zellorganellen mit dem ER	59
3.	Ultrastrukturelle Veränderungen der Zel- len als Funktion der Kohlenstoffquelle im Nährmedium	60
D.	<u>Diskussion</u>	62
E.	<u>Zusammenfassung</u>	77
F.	<u>Literaturverzeichnis</u>	80
G.	<u>Bildteil</u> (Anhang)	

G. Bildteil

Bilder	1 mit 10	Tafel I
Bilder	11 mit 17	Tafel II
Bilder	18A mit 25	Tafel III
Bilder	26 mit 30	Tafel IV
Bilder	31 mit 37	Tafel V
Bilder	38 mit 41	Tafel VI
Bilder	42 mit 49	Tafel VII
Bilder	50 mit 54	Tafel VIII
Bilder	55 mit 63	Tafel IX
Bilder	64 mit 71	Tafel X

A. Einleitung

Bei der Keimung von Ölsamen werden die Reservefette, die in Sphärosomen (Oleosomen oder Lipidbodies) gespeichert sind, mit Hilfe des Enzyms Lipase in Glycerin und freie Fettsäuren gespalten (Ory et al., 1968; Muto und Beevers, 1974). Letztere werden in den Glyoxysomen nach dem in Abb. 1 dargestellten Stoffwechselweg in Succinat umgewandelt, aus dem schließlich vermutlich in Mitochondrien und Plastiden Zucker synthetisiert werden, die dem Keimling als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Verfügung stehen (Breidenbach und Beevers, 1967; Beevers, 1969). Dieser Weg der Mobilisierung der Speicherfette scheint bei allen bislang untersuchten Pflanzenarten identisch zu sein, ohne Rücksicht darauf, ob die Triglyceride im Endosperm oder in den Kotyledonen des Embryos gespeichert werden (Tolbert, 1971; Vigil, 1973; Frederick et al., 1975). Der zellphysiologische Mechanismus des Abbaues der Reservefette war bislang nur beim Ricinus-Endosperm genauer untersucht worden, wo man eine "saure Lipase" in der Membran der Sphärosomen nachwies (Ory et al., 1968; Muto und Beevers, 1974). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, daß im Gegensatz dazu in fettreichen Kotyledonen der Keimlinge verschiedener Pflanzenspezies nur eine "alkalische Lipase" vorkommt; sie ist z.B. beim Raps mit einer distinkten Membranfraktion assoziiert, die nicht die sphärosomale Grenzmembran darstellt (Theimer und Rosnitschek, 1978). Während somit Ort und Mechanismus der Lipolyse je nach Art des Speichergewebes der Keimlinge unterschiedlich zu sein scheinen, geht aus zahlreichen Untersuchungen eindeutig hervor, daß die Glyoxysomen solcher

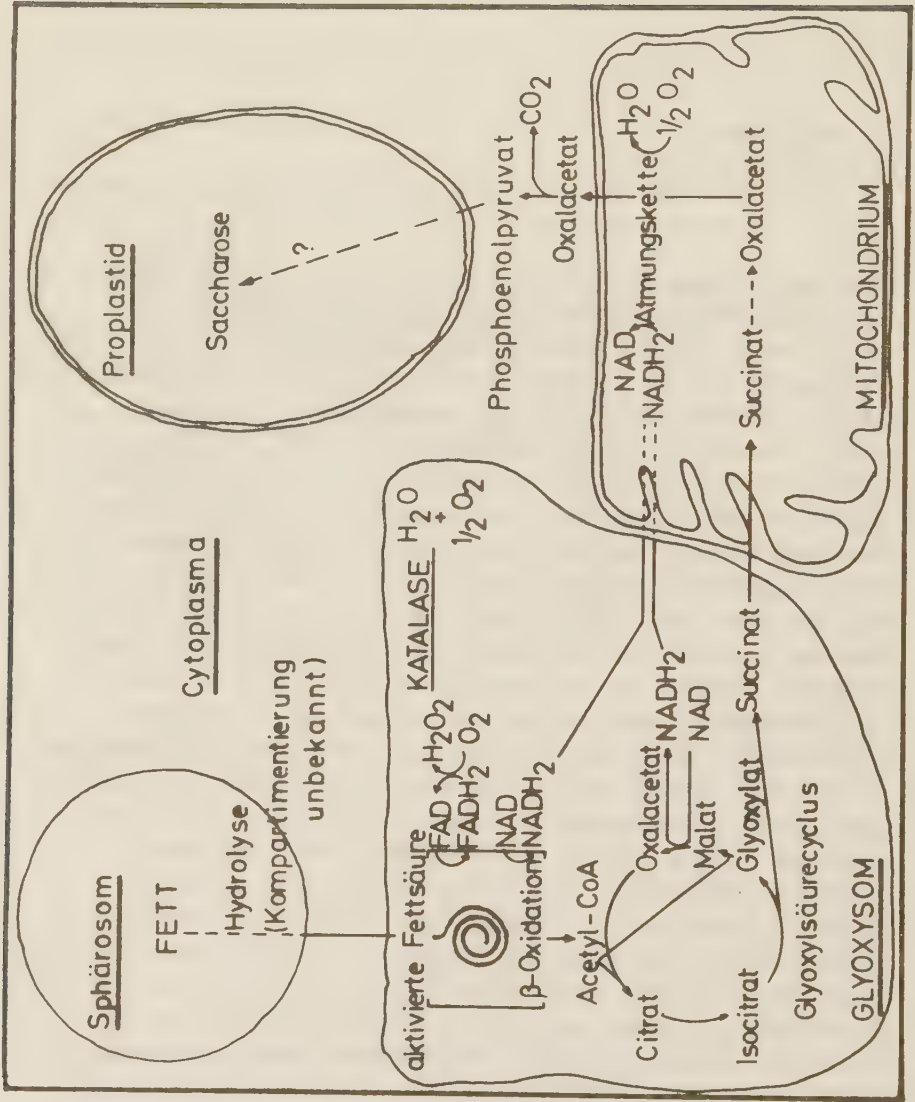


Abb.1:

Schema zur Kompartimentierung des Stoffwechselweges
 Fett → Saccharose (vgl. Text). (verändert nach
 Gerhardt, 1974b)

Gewebe bei verschiedenen Pflanzenarten im wesentlichen identische biochemische Merkmale besitzen (Zusammenfassung siehe Vigil, 1973). Morphologisch zählen die Glyoxysomen zu einer Gruppe von Zellorganellen, den Microbodies, deren Proteinmatrix in elektronenmikroskopischen Aufnahmen granulär erscheint, gelegentlich parakristalline oder amorphe, kontrastreiche Einschlüsse enthalten kann, aber keine membranösen Innenstrukturen aufweist; sie werden vom Cytoplasma durch eine einfache Elementarmembran abgegrenzt. (Vigil, 1970, 1973; Tolbert, 1971; Frederick et al., 1975). Microbodies sind mit einem Durchmesser von 0.2 - 4 μm meist kleiner als Plastiden, im Profil rund bis elliptisch oder gelegentlich keulenförmig (Vigil, 1973).

In den ersten Tagen des Keimlingswachstums nehmen die Glyoxysomen an Zahl und Enzymaktivitäten kräftig zu (Gerhardt und Beevers, 1970 ; Tolbert, 1971; Gerhardt, 1973). Als sichtbarer Ausdruck eines sehr engen physiologischen Zusammenspiels wird der in elektronenmikroskopischen Aufnahmen häufig beobachtete Kontakt zwischen Sphärosomen und Glyoxysomen angesehen (Vigil, 1970; Gruber et al., 1970; Trelease et al., 1971). Wenn der größte Teil der Fettreserven verbraucht ist verschwinden die glyoxysomalen Enzymaktivitäten aus dem Speichergewebe. Bei epigäisch keimenden Samen ergrünen die Kotyledonen nach dem Heraustreten der Keimlinge ans Tageslicht und bilden so die ersten Photosyntheseorgane des heranwachsenden Pflänzchens, das somit von seinen Reservefetten unabhängig wird (Schnarrenberger et al., 1971; Gerhardt, 1973). Neben den Plastiden unterliegen bei diesem Differenzierungsvorgang des Mesophylls der Keimblätter insbesondere die Microbodies (Glyoxysomen) drastischen biochemischen Veränderungen: Das typisch glyoxysomale Enzymsystem wird durch die Aktivitäten der Enzyme des Glykolatweges (siehe Abb.2) ersetzt, die ebenfalls in der Microbody-Fraktion

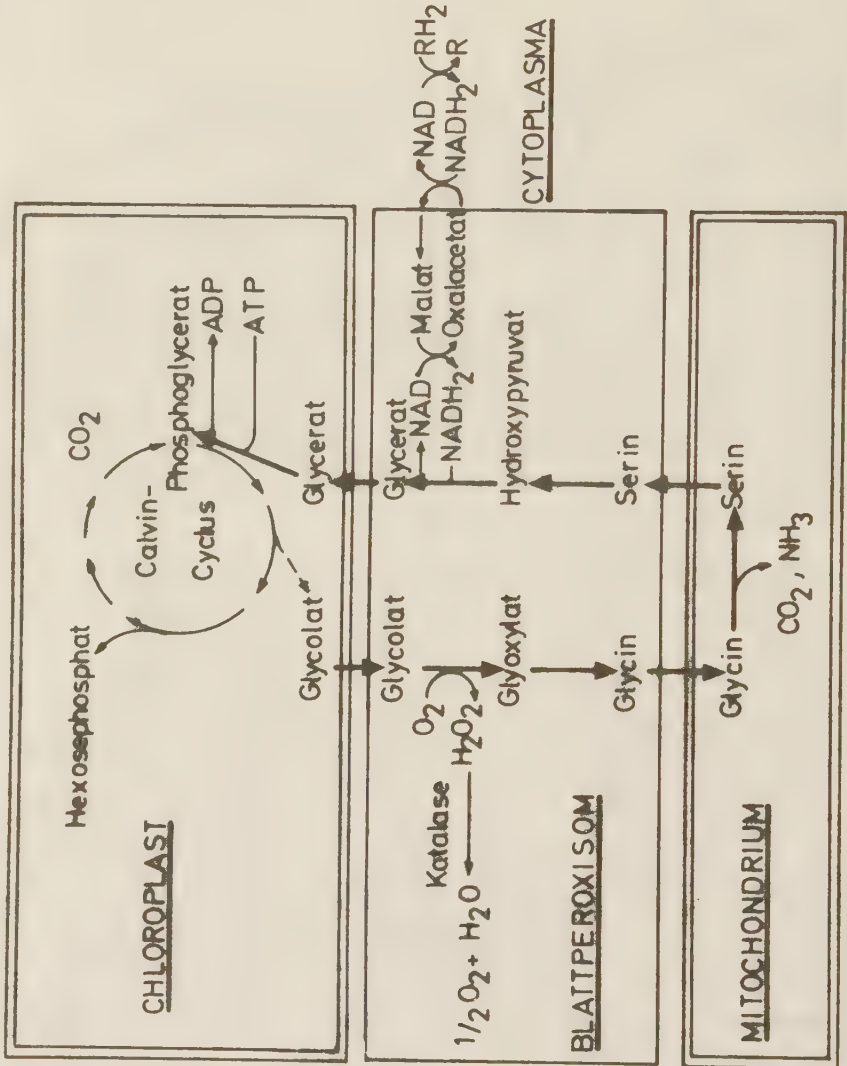


Abb.2:

Schema zur Kompartimentierung des Glycolatstoffwechsels (vgl. Text). (verändert nach Gerhardt, 1974b).

der Zellen lokalisiert sind (Zusammenfassung: Tolbert, 1971; Frederick et al., 1975). Dieser zweite Typ von Microbodies, die Blattperoxisomen, unterscheidet sich in elektronenmikroskopischen Bildern morphologisch nicht von den Glyoxysomen, steht aber häufig in engem Kontakt zu den Chloroplasten und Mitochondrien. Dies wird ebenfalls als Hinweis für ihr physiologisches Zusammenwirken mit diesen Zellkompartimenten gewertet (Abb. 2).

Trotz zahlreicher biochemischer Untersuchungen über diese Änderung der Microbody-Funktion (Zusammenfassung s. Gerhardt und Betsche, 1976) gibt es bis heute noch keine eindeutigen Vorstellungen über den zugrundeliegenden Mechanismus. Im wesentlichen werden drei Hypothesen diskutiert:

(1) Nach dem Abbau der einen Microbody-Population (Glyoxysomen) wird z.B. durch Licht die de novo Synthese der zweiten Microbody-Population (Blattperoxisomen) induziert. Diese Annahme stützt sich vor allem auf Befunde von Kagawa et al. (1975). Bei Belichtung etiolierter Wassermelonenkeimlinge, deren glyoxysomale Enzymaktivitäten in den Kotyledonen auf ein Minimum abgesunken waren, wurde ein lichtabhängiger, zusätzlicher Einbau von radioaktiv markiertem Cholin in die Membranen der Microbody-Population beobachtet und als Hinweis auf eine Neusynthese von Blattperoxisomen gedeutet.

(2) Die ursprünglich vorhandene Microbody-Population bleibt erhalten, die Organelle ändern aber ihre Funktion durch Inaktivierung (Theimer, 1976) oder Abbau glyoxysomaler Enzymaktivitäten und Aktivierung oder Inkorporation der blattperoxisomalen Enzyme (Frederick et al., 1975). Diese Hypothese stützt sich auf zahlreiche unterschiedliche Daten, wie z.B. das Fehlen einer lichtbedingten

Dichtezunahme ganzer Microbodies, wenn Kotyledonen in Gegenwart von D_2O belichtet wurden (Theimer et al., 1975); unter diesen Bedingungen erhöhte sich auch nicht die Dichte der blattperoxisomalen Katalase (Gerhardt, 1973), noch konnte mit radioaktiv markierten Vorstufen eine lichtabhängige Neusynthese des Enzyms entdeckt werden (Gerhardt und Betsche, 1976). Außerdem wurden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Kotyledonen in den Übergangsstadien lediglich Gestaltveränderungen der Microbodies durch cytoplasmatische Invaginationen entdeckt (Gruber et al., 1973; Frederick et al., 1975); es wurden bislang weder entstehende "Prä-Peroxisomen" beobachtet, wie sie für die ergrünenden Laubblätter typisch sind (Gruber et al., 1973), noch glyoxysomale Abbaustadien gefunden, wie sie Vigil (1970) im autolysierendem Ricinus-Endosperm nachweisen konnte.

(3) Als neue Alternative schlugen Schopfer et al. (1976) schließlich vor, daß Glyoxysomen einem schnellen Umsatz unterliegen könnten. Nach der Lichtinduktion würden dann sukzessive Microbodies produziert, die in den Übergangsstadien "Glyoxy-Peroxisomen" sein könnten, bis schließlich nur noch Peroxisomen synthetisiert würden. Im wesentlichen untermauern elektronenmikroskopische Aufnahmen diese Hypothese; sie zeigen im Verlauf der Entwicklung von Senfkeimlingen wechselnde Kontakte der Microbodies zunächst mit Sphärosomen, dann mit Sphärosomen und Plastiden und letztlich nur noch mit Plastiden.

Exogene Induktoren für diese Funktionsänderung der Microbodies können Licht, das vermutlich über das Phytochromsystem wirkt (Drumm und Schopfer, 1974; Schopfer et al., 1976) sowie Cytokinine (Theimer et al., 1976) sein.

Auch in Pilzzellen wurden die Enzymaktivitäten, die typisch für Glyoxysomen höherer Pflanzen sind bereits nachgewiesen, wobei über ihre intrazelluläre Lokalisation nur wenige, widersprüchliche Angaben vorliegen (Zusammenfassung: Vigil, 1973). Es gibt aber einige elektronenmikroskopische Berichte über das Vorkommen von Microbodies in Pilzen (Zusammenfassung: Maxwell et al., 1975). Ähnlich wie bei höheren Pflanzen durch Licht oder Phytohormone können bei Pilzzellen die Aktivitäten des Glyoxylsäurezyklus durch Substratänderung sehr stark verändert werden. Dient eine C_2 -Verbindung als einzige Kohlenstoffquelle, so werden diese Enzymaktivitäten kräftig gesteigert; sie verschwinden aber in Gegenwart von Glucose im Nährmedium (Flavell und Woodward, 1970, 1971; Theimer et al., 1978b). Da der Glyoxylsäurezyklus in Pilzen sehr wahrscheinlich ebenfalls in Microbodies lokalisiert ist (Kobr et al., 1969; Theimer, 1973), ergibt sich daraus ebenfalls die Frage, ob in vorhandenen Microbodies nur zusätzlich Enzyme aktiviert oder inkorporiert werden, oder ob dabei neue Organellen entstehen. Letzteres wurde kürzlich für Candida-Hefen gezeigt, die bei Wachstum auf Methanol oder Alkanen als Kohlenstoffquelle zusammen mit den anapleurotischen Enzymsystemen auch eine drastische Zunahme an Microbody-ähnlichen Zellorganellen aufweisen (Osumi et al., 1974; Sahm et al., 1975; Van Dijken et al., 1975).

Da Microbodies nicht zur eigenen Proteinsynthese befähigt sind, müssen ihre Proteine wohl vom Kern kodiert und im Cytoplasma synthetisiert werden. Sie können also als einfache Modelle für die Regulation vollkommen kerngesteuerter Organellen eukaryontischer Zellen dienen. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die feinstrukturellen Veränderungen untersucht werden, die in den frühen Stadien

der Keimlingsentwicklung die dramatischen physiologischen Vorgänge beim Fettabbau und beim Ergrünen der Kotyledonen epigäisch keimender Samen begleiten. Dabei sollte zugleich darauf geachtet werden, ob die identischen Effekte von Licht und Kinetin auf die biochemische Änderung der Microbody-Funktion sich auch in einer eventuellen Strukturänderung ausdrücken. Auch bei eukaryontischen Microorganismen werden die Aktivitäten der für Microbodies höherer Pflanzenzellen typischen Enzyme an veränderte Wachstumsbedingungen offenbar schneller angepaßt als z.B. mitochondriale Enzymaktivitäten (Theimer et al., 1978b). Daher sollte bei *Neurospora crassa* die Auswirkungen der biochemisch wohl definierten, substratbedingten Veränderungen auf die Feinstruktur der Microbody-Population untersucht werden.

B. Material und Methoden

1. Anzuchtmethoden

1.1. Anzucht des Pflanzenmaterials

a) Keimlinge von Ölsamen

Samen von *Helianthus annuus* L. (Sorte "Heliosan", Saatgut der Bayerischen Saatgut und Futtermittelverwertungsstelle München) und *Citrullus vulgaris* (Sorte "Florida Giant", Fa. Olds Seed Company, Madison, Wisc. U.S.A.) wurden ausgelesen, 10 Minuten in einer 0,2 %igen Chinolol-Lösung oberflächensterilisiert und auf feuchtem Vermiculit in Plastikschaalen ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln in einem Brutschrank bei 28°C und relativer Luftfeuchtigkeit von 60-100 %. Alle Manipulationen an den Keimlingen wurden in einer Dunkelkammer unter schwachem Grünlicht ausgeführt. Die Belichtung der Keimlinge erfolgte im Weißlicht mit einer eingestrahnten Lichtintensität von ca. 1500 Lux, wobei eine Leuchtstoffröhre (Philips TL 20, Warmton de Luxe) als Lichtquelle diente. Als Tag 0 der Keimlingsentwicklung wurde der Zeitpunkt der Aussaat der Samen festgelegt.

1.2. Anzucht der *Neurospora crassa* "slime" Mutante

Die Stammkultur der zellwandlosen *Neurospora crassa* "slime" Mutante war ein Geschenk des Fungal Genetics Stock Centers (FGSC), Arcata, Calif. U.S.A.. Sie trägt die FGSC-Nummer 1118 und wird im folgenden als NC 1118

bezeichnet. Ihre genetischen Marker sind nach Emerson (1963) E b413-6A (A, os, fz, sg). Sie wächst auf Minimalmedium und benötigt lediglich mindestens 5 µg/l Biotin.

Nährmedien

Das Nährmedium (Vollmedium) für die Submerskultur der Mutante war wie folgt zusammengesetzt (Woodward und Woodward, 1969):

Nährsalzstammlösung nach Vogel (1956)	20	ml/l
Saccharose (Merck)	20	g/l
Polyäthylenglykol 200 (Merck)	50	ml/l
Hefeextrakt (Merck und Sigma)	5	g/l
Pepton (Merck)	7.5	g/l
Biotin	5	µg/l

Als Osmotikum zur Stabilisierung der Protoplasten-ähnlichen Zellen wurde anstelle der von Woodward und Woodward (1969) angegebenen Saccharose Polyäthylenglykol 200 verwendet. Diese Substanz verhält sich physiologisch inert, da es von den Zellen weder als Nährstoff verwertet werden kann, noch das Wachstum oder die Sauerstoffaufnahme der Mutante bei Wachstum auf anderen Substraten beeinflusst (Theimer, 1973). Sie eignete sich daher als "neutrales" Osmotikum insbesondere für die Inkubationsmedien.

Für die Anzucht und Erhaltung der Stammkulturen wurde das Vollmedium mit 2 % Agar versetzt. In einigen Fällen wurden die Zellen in einem Nährmedium angezogen, das anstelle von Saccharose 10 g/l Sorbit und 15 ml/l Äthanol bzw. Methanol als Kohlenstoffquelle enthielt.

Inkubationsmedium

Zur Dereprimierung der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus wurden auf Vollmedium 16 h lang gewachsene Zellen in Acetatmedium transferiert, das folgende Zusammensetzung hatte (Theimer et al., 1978b):

Nährsalzstammlösung nach Vogel (1956)	20 ml/l
Polyäthylenglykol 200	59 ml/l
Biotin	5 µg/l
Essigsäure/Natriumacetatpuffer pH 5.8	40 mM

Submerskulturen

Die Kulturen wurden zuerst mit der Impföse von den Agarnährböden auf Anzuchtkölbchen (50 ml Vollmedium/250 ml Erlenmeyerkölbchen) überimpft und auf einer Reziproschüttelmaschine mit ca. 70 Schüttelbewegungen/Minute im Dunkeln bei 29°C inkubiert. Die Schüttelfrequenz und das Verhältnis Nährmediumvolumen/Kolbenvolumen sind kritisch für die Aufzucht, da die Zellen einerseits sehr fragil sind, andererseits aber gute O₂-Versorgung zum Wachstum benötigen. Nach ca. 3 Tagen wurde aus dem Animpfkölbchen mit der Pipette steril auf 1 l-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Nährmedium überimpft, daß die Zelldichte ca. 10⁶ Zellen/ml betrug (bestimmt in der Neubauer Blutkörperchenzählkammer). Nach Anzucht bei 29°C im Dunkeln wurden die Zellen nach 16-48 Stunden geerntet. Dazu wurden die Zellen durch 4-minütige Zentrifugation bei 350 g sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 100 ml Waschmedium (59 ml/l Polyäthylenglykol, 20 ml/l Vogel's Nährsalzlösung) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich in vorgekühltem Extraktionsmedium resuspendiert und aufgeschlossen.

2. Behandlung der Keimlinge mit Cycloheximid oder Kinetin

Vor Beginn der Behandlung mit Cycloheximid bzw. Kinetin wurden die Hypokotyle der Sonnenblumen- bzw. Wassermelonenkeimlinge mit einer Rasierklinge je nach Alter 3-5 cm unter den Kotyledonen abgeschnitten. Die so entwurzelten Keimlinge wurden dann mit ihren Hypokotylen in 10 ml Bechergläschen gestellt, welche die entsprechenden Lösungen enthielten, nämlich 10^{-4} bzw. 10^{-5} M Kinetinlösung (6-Furfurylaminopurin) bzw. 2×10^{-4} M Cycloheximidlösung und bei 28°C im Brutschrank im Dunkeln bzw. im Licht gehalten. Die Lösungen wurden täglich erneuert. Als Kontrollen dienten intakte und entwurzelte Keimlinge, welche in destilliertem Wasser inkubiert wurden.

3. Trennung der Kotyledonen von Wassermelonenkeimlingen in Schwamm- und Palisadenparenchym.

Die Kotyledonen der Wassermelonenkeimlinge wurden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, abgetrocknet und zwischen zwei Glasobjektträger geklemmt. Mit einer entfetteten Rasierklinge wurden die einzelnen Kotyledonen oberflächenparallel durchtrennt, so daß die Kotyledonenoberseite etwa halb so dick war wie die Unterseite. Das Palisadenparenchym ist 2 (-3)-schichtig und macht etwa $1/3$ der Blattdicke aus, wie in lichtmikroskopischen Präparationen festgestellt wurde. Die so erhaltenen, unterschiedlichen Gewebepräparationen wurden getrennt homogenisiert und die Zellfraktionen isoliert.

4. Aufschluß und Zellfraktionierung

4.1. Kotyledonen

Zum Zellaufschluß wurde stets ein Extraktionsmedium folgender Zusammensetzung (Beever et al., 1974) verwendet:

Saccharose	0.5 M
EDTA	1.0 M
Tricine (pH 7.5)	0.15 M
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
Dithioerythrit	1 mg/ml Extraktionsmedium.

Jeweils etwa 20 Kotyledonen bzw. Gewebestücke wurden in vorgekühlten Reibschalen in 4 ml Extraktionsmedium pro Gramm Frischgewicht mit dem Pistill zerrieben bis ein möglichst homogener Brei entstanden war. Das Homogenat wurde durch Gaze gepreßt und anschließend 10 Minuten lang bei 755 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand (ÜI) zur Messung der Enzymaktivitäten verwendet.

4.2. Zellen der Neurospora crassa "slime" Mutante

Etwa 150 ml einer Zellsuspension der "slime" Mutante (ca. 4×10^9 Zellen/ml) wurden in 4 ml Extraktionsmedium in einer Reibschale mit dem Pistill 10 Minuten kräftig homogenisiert und das resultierende Rohhomogenat durch differentielle Zentrifugation weiter fraktioniert (Abb. 3).

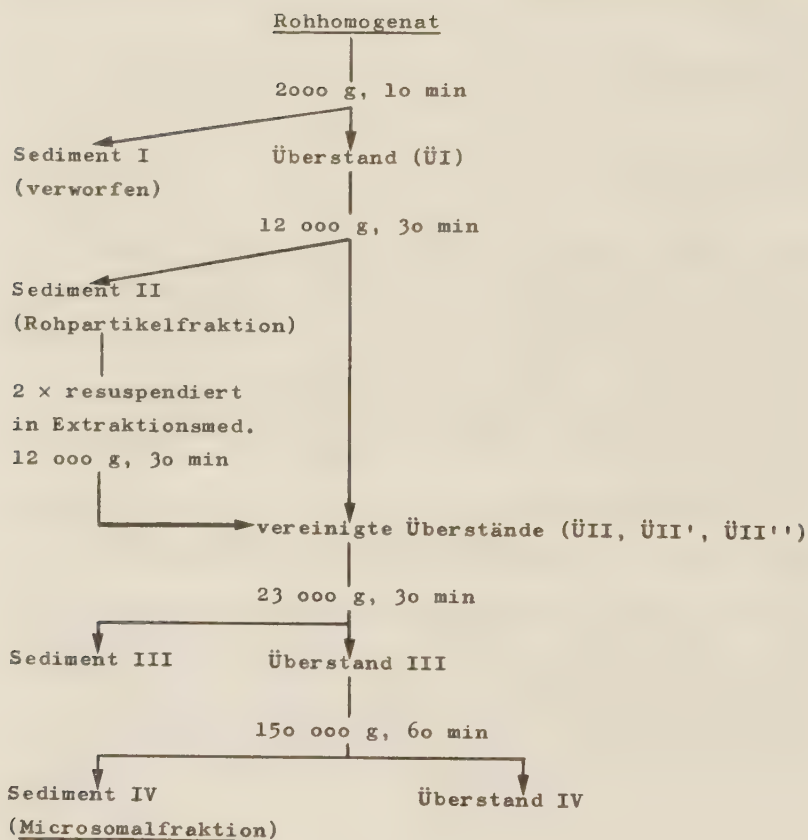


Abb.3:

Schema für die differentielle Zentrifugation von Rohhomogenaten der *Neurospora crassa* "slime" Mutante.

5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Enzymaktivitäten mit photometrischen Testmethoden mit einem Gilford Spektralphotometer Modell 2400 S bei Raumtemperatur (ca. 20°C) gemessen.

5.1. Cytochrom-c-Oxidase

(Ferrocycytochrom-c-oxygen-oxidoreductase E.C. 1.9.3.1)

(Nach Schnarrenberger et al., 1971).

Das Testgemisch enthielt in einem Endvolumen von 1 ml:

Phosphatpuffer (pH 7.0)	0.06	M
Cytochrom-c, reduziert	0,05	%
Digitoninlösung	10	µl
Enzymlösung	10	µl

Enzym- und Digitoninlösung wurden zunächst 1 Minute vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestartet und die Oxidation des Cytochrom-c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt.

5.2. NADH₂-Cytochrom-c-Reduktase

(NADH₂:Ferricytochrom-c (b5)-Oxidoreductase E.C. 1.6.2.a)

(Nach Lord et al., 1973)

Das Testgemisch enthielt in einem Endvolumen von 1 ml:

Phosphatpuffer (pH 7.2)	0.032	M
Cytochrom-c, oxidiert	0,05	%
NADH ₂	0,211	mM
Enzymlösung	2-25	µg Protein

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Extraktes gestartet und die Reduktion des Cytochrom-c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt.

5.3. Glykolatoxidase

(Glyoxylat: NAD-Oxidoreductase E.C. 1.1.1.79)

(Tolbert et al., 1968)

Der Testansatz enthielt in einem ml:

Phosphatpuffer (pH 7.0)	45 mM
EDTA	3 mM
Dithioerythrit	0,02 %
Phenylhydraziniumchlorid	3,3 mM
Glykolat	5 mM
Enzymlösung	20-50 µg Protein

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glykolat gestartet und die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 324 nm verfolgt.

5.4. Isocitratlyase

(threo-D_s-Isocitrat-Glyoxylate-Lyase E.C. 4.1.3.1.)

(nach Dixon und Kornberg, 1959)

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml:

Phosphatpuffer (pH 6.9)	85 mM
Dithioerythrit	4 mM
MgCl ₂	4.5 mM
Phenylhydraziniumchlorid	10.0 mM
Threo-D _s -Isocitrat	4.0 mM
Triton-X-100	0,01 %
Enzymlösung	2-25 µg Protein

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und die Extinktionszunahme bei einer Meßstrahlung von 324 nm verfolgt.

5.5. Katalase

(H₂O₂:H₂O₂-Oxidoreductase E.C. 1.11.1.6.)

(nach Lück, 1965)

Testansatz in 1 ml Endvolumen:

Phosphatpuffer (pH 7.0) 0.06 M

H₂O₂ 0.01 M

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung gestartet. Die Anfangsrate der Zersetzung des H₂O₂ (ca. 20 sec.) wurde bei einer Meßstrahlung von 240 nm im Spektralphotometer verfolgt.

5.6. Malatsynthetase

(L-Malate:Glyoxylate:Lyase (CoA-acetylating E.C. 4.1.3.2.)

(nach Hock und Beevers, 1966)

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml:

Tris-Puffer (pH 8.0) 0.1 M

5,5'-Dithiobis-(2-nitro)benzoat) 1 mM

MgCl₂ 0.5 mM

Acetyl-Coenzym A 1 mM

Natriumglyoxylat 3.3 mM

Enzymlösung 2-25 µg Protein

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glyoxylat gestartet und bei einer Wellenlänge von 412 nm im Photometer verfolgt.

5.7. Peroxidase

(Ferrocytochrome-c-hydrogenperoxide-Oxidoreductase

E.C. 1.11.1.5.)

5.7.1. Benzidintest nach Gregory (1966)

Der Testansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 ml gesättigte Lösung von Benzidin in Äthanol + 98 ml

Natriumcitratpuffer (100 mM, pH 5.3), davon 1 ml

Ascorbinsäurelösung in H₂O 1 mM 1 ml

H₂O₂ 200 mM 1 ml

Nach Zugabe von 100-500 µl Enzymlösung bzw. 0.1 ml

suspensierter *Neurospora crassa* "slime" Zellen wurde die Zeit bis zum Eintreten der Blaufärbung gestoppt. Sie ist ein Maß für die Aktivität der Peroxidase.

5.7.2. Guajakoltest nach George (1953)

Testansatz mit Volumen 1 ml:

Phosphatpuffer (pH 5.4) 10 mM

Guajacol 6.7 mM

H₂O₂ 0,06 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Enzymlösung gestartet und die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 470 nm im Spektralphotometer verfolgt.

6. Bestimmung des Proteingehaltes und der Gesamtlipide

Der apparente Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standard dienten Rinderserumalbuminlösungen.

Zur Bestimmung des Gesamtlipidgehalts der Wassermelonenkotyledonen in den verschiedenen Entwicklungsstadien wurde der Rohextrakt (ÜI) mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherlösliche Phase wurde jeweils in einem Wägegläschen gesammelt. Nach dem Verdunsten des Äthers wurde der Lipidgehalt gravimetrisch bestimmt.

7. Präparation des Pflanzenmaterials für die Elektronenmikroskopie

7.1. Kotyledonen von Sonnenblumen-, Raps- und Wassermelonengeimlingen

Die Kotyledonen wurden im Fixierungsgemisch mit einer entfetteten Rasierklinge in dünne Streifen längs und anschließend in kleine Würfelchen quer geschnitten. Das Fixierungsgemisch bestand aus :

K-Phosphat-Puffer pH 5.8 50 mM = Puffer A
Gluar dialdehyd 3 % (w/v)

Die Fixierung dauerte 2 Stunden und wurde wie alle weiteren Manipulationen bei Raumtemperatur durchgeführt (soweit nichts

anderes angegeben). Die fixierten Gewebeteilchen wurden anschließend 8 mal im Puffer A gewaschen und dann in ein zweites Fixierungsgemisch überführt. Dieses setzte sich folgendermaßen zusammen :

Puffer A

OsO_4 2 % (w/v)

Dieser zweite Fixierungsschritt dauerte ca. 16 Stunden. Die so fixierten Gewebestückchen wurden 3 Stunden gewaschen und anschließend nach Kellenberger et al. (1958) kontrastiert. Das Kontrastierungsgemisch bestand aus

5,5' Diäthylnatriumbarbiturat	20 mM
CaCl_2	10 mM
Na-Acetat	5 mM
Uranyl-Acetat	0,5 % (w/v)

und wurde mit HCl auf pH 5.0 eingestellt.

Nach einstündiger Kontrastierung wurden die Gewebestückchen 60 Minuten gewaschen und anschließend in einer Serie von Lösungen steigender Acetonkonzentrationen nach folgendem Schema entwässert:

Acetonkonzentration: 25, 50, 75, 90, 100, 100, 100 % je 10 min. Die so entwässerten Gewebestückchen wurden anschließend in Spurr's Medium (1969) eingebettet.

7.2. Zellen der Neurospora crassa "slime" Mutante

Fixierung

Die Zellen von 5 ml Submerskultur wurden in einer Runne Tischzentrifuge bei 3000 Upm 2 Minuten lang bei Zimmertemperatur abzentrifugiert, mit Waschmedium (siehe 1.2) gewaschen und die Überstände verworfen. Das Sediment wurde vorsichtig in einem Fixierungsgemisch (Gemisch A + 3 % Glutardialdehyd) resuspendiert. Gemisch A setzte sich zusammen aus :

Sörensen-Phosphatpuffer 1/15 M (pH 6.9)

MgCl₂ 5 mM

Saccharose oder Sorbit 10 % (w/v)

Die Fixierungsdauer betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das Fixativ wurde anschließend sorgfältig ausgewaschen, indem die fixierten Zellen bei 3000 Upm abzentrifugiert, mehrmals im Gemisch A resuspendiert und jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Nachfixierung und Kontrastierung der Zellen mit OsO₄

Die vorfixierten und gewaschenen Zellpräparate wurden in einem Nachfixierungsgemisch, das aus 2 % OsO₄ in Gemisch A bestand, mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate einmal mit Gemisch A gewaschen.

Entwässern

Die Entwässerung der fixierten Zellen erfolgte wie unter 7.1. angegeben.

7.3. Präparation der Microsomalfraktion der Nc 1118 Zellen für die Elektronenmikroskopie

Zur Fixierung der Microsomalfraktion der differentiellen Zentrifugation (siehe Abb.1) wurde das Sediment IV in ein Fixierungsgemisch überführt, welches 3 % Glutardialdehyd in Puffer A enthielt (Gemisch A, siehe 7.2.). Die Fixierungsdauer betrug 2 Stunden bei 0-4°C. Die weitere Präparation erfolgte nach den unter 7.2. angegebenen Methoden.

7.4. Einbettung

Das zur Infiltration benutzte Einbettungsmittel (Spurr, 1969) hat vier Komponenten:

Epoxyharz	ERL-4206
Weichmacher	DER-736
Härter	NSA
Beschleuniger	S-1

Diese Komponenten wurden wie folgt gemischt:

ERL-4206	10.0 g
DER-736	6.0 g
NSA	26.0 g
S-1	0.4 g

Nach der letzten Entwässerungsstufe (100 % Aceton) wurden die fixierten Präparate zunächst mit einer Lösung von Einbettungsmittel in 100 % Aceton (1:1) durchtränkt und nach weiteren 30 Minuten in eine Lösung von Kunstharz in 100 % Aceton (2:1) überführt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Präparate mit unverdünntem Einbettungsmittel infiltriert. Nach weiteren 30 Minuten wurde das 100 %ige Spurr-Medium erneuert und die Präparate für 4-6 Stunden inkubiert. Danach wurden sie in Einbettungsmittel gefüllte Gelatine kapseln eingebettet. Zur Polymerisation des Kunstharzes wurden die Proben 16 Stunden lang bei 70 °C gehalten.

7.5. Herstellung der Ultradünnschnitte

7.5.1. Schneiden der Proben

Die Präparate wurden mit einem Pyramidenschneidegerät ("Pyramitom", LKB) "getrimmt" und mit einem LKB-Ultratome III mit Glasmessern geschnitten. Die silbergrauen Schnittserien (ca. 500 Å) wurden mit Xyloldämpfen gestreckt und auf Formvar-befilmte Kupfernetzchen (VECO) aufgenommen. Zur Erhöhung der mikroskopischen Auflösung wurden einige Schnitte auf besonders engmaschige, unbefilmte Kupfernetzchen aufgenommen.

7.5.2. Nachkontrastierung der Schnitte

Die Nachkontrastierung der Schnitte erfolgte in zwei Schritten: Im ersten Kontrastierungsschritt wurden die Schnitte auf den Kupfernetzchen in einer gesättigten Uranylacetatlösung, die unmittelbar vor Kontrastierungsbeginn mit abs. Äthanol auf 2/3 ihrer Konzentration verdünnt wurde, 7 Minuten lang gehalten. Anschließend wurden sie 10 Minuten lang mit aqua bidest. gewaschen und dann 9 Minuten in einer 80 mM Bleicitratlösung (pH 13.5) kontrastiert. Die fertig kontrastierten Schnitte wurden anschließend 1 Minute in 0.02 N NaOH und dann 5 Minuten in aqua bidest. gewaschen.

7.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Schnitte

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop der Firma Siemens (Elmiskop 101) ausgewertet. Die Betriebsspannung betrug 80 kV.

8. Anfertigen der lichtmikroskopischen Präparate

Die auspolymerisierten Präparate der Gewebestückchen wurden mit dem "Pyramidenschneidegerät" so getrimmt, daß an der späteren Schnittfläche ein Kotedo senkrecht zur Kotedooberfläche getroffen wurde. Mit einem LKB-Ultratome III wurden Dünnschnitte mit einer Dicke von etwa 0.5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden in Wassertropfen auf Glasobjektträger überführt, unter gelinder Erwärmung gestreckt und nach dem Trocknen in Caedax (Fa. Merck) eingebettet. Diese Dauerpräparate wurden im Lichtmikroskop fotografiert und ausgewertet.

9. Cytochemischer Nachweis der katalasehaltigen Strukturen in den Gewebestückchen

Der cytochemische Nachweis der katalasehaltigen Strukturen erfolgte während der Präparation für die Elektronenmikroskopie, unmittelbar nach der Fixierung mit Glutardialdehyd. Dazu wurden die Gewebestückchen mit Diaminobenzidinhydrochlorid und H_2O_2 30 Minuten lang bei $37^\circ C$ inkubiert (Fahimi, 1969). Dieses Inkubationsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

Diaminobenzidinhydrochlorid	0.2	%
Aminomethylpropandiolpuffer pH 9,7	50.0	mM
KCN	5	mM
H_2O_2	0.03	%

Gleichzeitig wurden folgende Kontrollansätze durchgeführt:

- a) gleicher Ansatz, aber ohne H_2O_2 (Substrat)
- b) gleicher Ansatz, zusätzlich 5 mM Aminotriazol als Hemmstoff für Katalase (Margoliash und Novogrodsky, 1958).

10. Anfertigung des dreidimensionalen Microbody-Modelles

Von 14 aufeinanderfolgenden Ultradünnschnitten wurden die mit DAB-Reaktionsprodukt kontrastierten Microbody-Profile eines Zellausschnittes photographiert und auf Klarsichtfolien durchgezeichnet. Diese Folien wurden auf einen Karton geklebt, dessen Dicke genau der Schnittdicke bei gegebener Vergrößerung entsprach und in Schnittreihenfolge zu einem dreidimensionalen Modell zusammengeklebt.

11. Projektionsmodell der Mitochondrien

Für das Projektionsmodell der Mitochondrien wurden Serienschnitte photographiert und die Mitochondrien-Profile auf

Klarsichtfolien durchgezeichnet (je 1 Schnitt auf je eine Folie). Folie 1 und 2 wurden übereinandergelegt und die überlappenden Mitochondrien-Profile mit ihrer gemeinsamen Begrenzung auf eine neue Folie 2' übertragen. Diese Folie 2' wurde nun mit 3 zu 3' kombiniert usw. Als Resultat ergab sich die räumliche Projektion aller, in einem bestimmten Zellvolumen zusammenhängenden Mitochondrien.

C. Ergebnisse

I. Differenzierung fettspeichernder Kotyledonengewebe in photosynthetisch aktives Mesophyll

1. Mobilisierung der Reservefette

Wie aus den Aufnahmen der elektronenmikroskopischen Präparate von fettspeichernden Kotyledonen von Wassermelonen (Bilder 1, 6, 15, 16, 17), Sonnenblumen (Bilder 5, 12) und Raps (Bilder 3, 4, 11, 13) deutlich hervorgeht, sind die Sphärosomen durch eine offensichtlich osmiophile Grenzschrift vom umgebenden Cytoplasma abgesetzt. Diese erscheint im elektronenmikroskopischen Bild als einfache dunkle Linie und wird nur bei kräftiger Kontrastierung des Präparates gut sichtbar, was widersprüchliche Befunde über das Vorkommen einer solchen sphärosomalen Grenzschrift erklären könnte (Frey-Wyssling und Mühlethaler, 1965; Hrsel, 1966; Schwarzenbach, 1971; Yatsu und Jacks, 1972). Auch bei hoher Auflösung, bei der die Dreifachschichtung (dunkel-hell-dunkel) der Elementarmembranen in den Aufnahmen ganz klar erkennbar ist, findet sich keine weitere Unterteilung dieser Grenzschrift (Bild 1). Sie ist auch mit 30-40 Å nur etwa halb so dick wie die typischen Elementarmembranen; sie entspricht in ihrer Struktur daher genau der von Yatsu und Jacks (1972) für Sphärosomen aus Erdnußkotyledonen beschriebenen halben Elementar-

membran ("half unit membrane"), deren Analyse eine Zusammensetzung aus Proteinen und Phospholipiden ergeben hatte. Darüberhinaus zeigt Bild 2 aber, daß die osmiophile Grenzschicht der Sphärosomen in den Kotyledonen ruhender Sonnenblumensamen in die beiden osmiophilen Schichten einer atypischen Elementarmembran übergeht (s. Pfeile), die somit einen Membranfortsatz des Sphärosoms bildet. Dieser zeichnet sich durch eine besonders dicke, elektronentransparente Mittelschicht aus und kann somit keiner bislang bekannten Membranfraktion zugeordnet werden. In elektronenmikroskopischen Präparationen der Kotyledonen von Wassermelonen-, Sonnenblumen- und Rapskeimlingen treten ebenfalls Sphärosomen auf, welche derartige "henkelartige" Fortsätze besitzen, die einer einfachen Elementarmembran mit atypisch dicker Mittelschicht gleichen (Bilder 3, 4, 5, 6). Offensichtlich bilden diese Fortsätze zusammen mit den Sphärosomen eine Einheit, wobei das durch seine charakteristische Elektronentransparenz gekennzeichnete Lipidmaterial im Sphärosom direkt in die Mittelschicht des Membranfortsatzes übergeht. Diese Fortsätze können auch cytoplasmaseitig dicht mit Ribosomen besetzt sein; dies wurde jedoch stets nur an Sphärosomen beobachtet, die noch prall mit Fett gefüllt erschienen und keine Anzeichen von Fettabbau zeigten (Bilder 7, 8, 9, 10). Solche "rauh" Fortsätze unterschieden sich vom "rauh" ER in der Dicke der Membran (ca. 100 Å), im eindeutigen Fehlen der Doppelmembranstruktur, die für das rauhe ER typisch ist und in der klaren Verbindung zum Sphärosom. In Entwicklungsstadien der Keimlinge, wo der meßbare Fettabbau am höchsten ist (Gerhardt, 1973; Theimer und Rosnitschek, 1978; Abb. 5) überwiegen henkel- oder schwanzartige Membranfortsätze an den Sphärosomen (Bilder 3, 4, 5, 6, 13), die frei von Ribosomen sind und eine bis zu 150 Å dicke Mittelschicht besitzen; die Gesamtdicke solcher atypischer Elementar-

membranen beträgt dann 200-250 Å. Darüber hinaus wurden z.B. in den Kotyledonen in nahezu allen untersuchten Entwicklungsstadien Sphärosomen beobachtet, die durch ihre geringe Größe und durch offensichtliche cytoplasmatische Invaginationen auffielen (Bilder 14, 15, 16). Schließlich bleiben in den Zellen Vesikel mit cytoplasmatischem Inhalt zurück, die von solchen einfachen Elementarmembranen mit atypisch dicker Mittelschicht gebildet werden (Bild 17).

Derartige bislang in der Literatur noch nicht beschriebene Membranfortsätze der Sphärosomen wurden auch in elektronenmikroskopischen Präparaten der lipasehaltigen Membranfraktion entdeckt, die mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation von anderem Membranmaterial der Mikrosomalfraktion abgetrennt werden konnte (Rosnitschek, 1977; Theimer und Rosnitschek, 1978; Wanner und Theimer, 1978). Dies ist als deutlicher Hinweis zu werten, daß diese Fortsätze die Orte der Lipolyse in den fettabbauenden Mesophyllzellen der Kotyledonen sind.

Im Gegensatz zu den Sphärosomen unterliegen die Microbodies (Glyoxysomen) der Kotyledonen in diesen ersten Keimungsstadien keinen auffallenden strukturellen Veränderungen. Wie aufgrund ihrer metabolischen Abhängigkeit zu erwarten war, wurden in den elektronenmikroskopischen Präparationen bei allen untersuchten Objekten enge räumliche Kontakte zwischen Sphärosomen und Glyoxysomen festgestellt, wie sie auch schon von anderen Autoren berichtet worden waren (Gruber et al., 1970; Vigil, 1973). In den vorliegenden Untersuchungen ergaben sich allerdings zwei Kategorien solcher Kontakte:

Die Elementarmembran der Microbodies steht in direkter Berührung mit der "half unit membrane" der Sphärosomen, die auch von den Microbodies geradezu umhüllt werden können (Bilder 11, 12, 13).

In einzelnen Fällen wurden aber auch Kontakte zwischen den Membranfortsätzen der Sphärosomen und den Microbodies beobachtet (Bild 13).

In allen Fällen sind die Kontakte so eng, daß auch bei höchster Vergrößerung der Berührungsstellen nicht mehr zwischen Microbody-Elementarmembran und Sphärosomen-"half unit membrane" unterschieden werden konnte, was auf ein "Verschmelzen" der Membranstrukturen hindeuten würde.

2. Änderung der Funktion der Microbodies von Glyoxysomen in Blattperoxisomen

Mit dem weitgehenden Abbau der Reservefette der Mesophyllzellen verschwinden auch die glyoxysomalen Enzymaktivitäten aus der isolierbaren Microbodypopulation und die typischen Enzymaktivitäten der Blattperoxisomen nehmen zu (Gruber et al., 1970; Schnarrenberger et al., 1971; Gerhardt, 1973; Kagawa et al., 1973; Drumm und Schopfer, 1974; Kagawa und Beevers, 1975). Diese Änderung der Funktion der Microbodies wird offenbar durch Licht und Cytokinine gesteuert (Theimer et al., 1976; 1978a).

2.1. Änderung der Enzymaktivitäten der Microbodies in Kotyledonen von Wassermelonenkeimlingen

Die ursprünglich fettreichen Speicherzellen der Kotyledonen differenzieren sich nach Belichtung in die ersten photosynthetisch aktiven Mesophyllgewebe der Keimlinge. Da bereits die Kotyledonen ruhender Samen anatomisch den Laubblättern ähneln, stellt sich die Frage, ob es physiologisch meßbare Unterschiede in der Differenzierung der beiden Gewebeschichten des Mesophylls der Kotyledonen gibt und wann sie im Verlauf der Entwicklung des Keimlings in Erscheinung treten.

Daher sollte untersucht werden, ob es eventuelle Unterschiede in der Entwicklung der Leitenzyme der Microbodies zwischen Schwamm- und Palisadenparenchym gibt. Zwar war eine absolute Trennung des Palisadenparenchyms und des Schwammparenchyms der Wassermelonenkotyledonen durch Längsschneiden experimentell nicht möglich (s. Abb. 4), dennoch konnte aber dadurch z.B. in der adaxialen Hälfte des Kotyledo der Anteil des Schwammparenchyms zu Gunsten des Palisadenparenchyms sehr stark verringert werden.

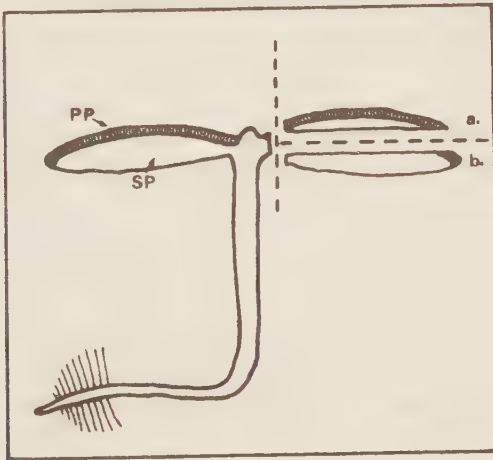


Abb. 4:

Schematische Darstellung der Trennung der Wassermelonkotyledonen in eine Palisadenparenchym-reiche (a) und eine Schwammparenchym-reiche (b) Fraktion.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, beginnt im Palisaden- wie im Schwammparenchym der Abbau der Reservefette am 2. Tag nach dem Keimungsbeginn, was sich deutlich in der

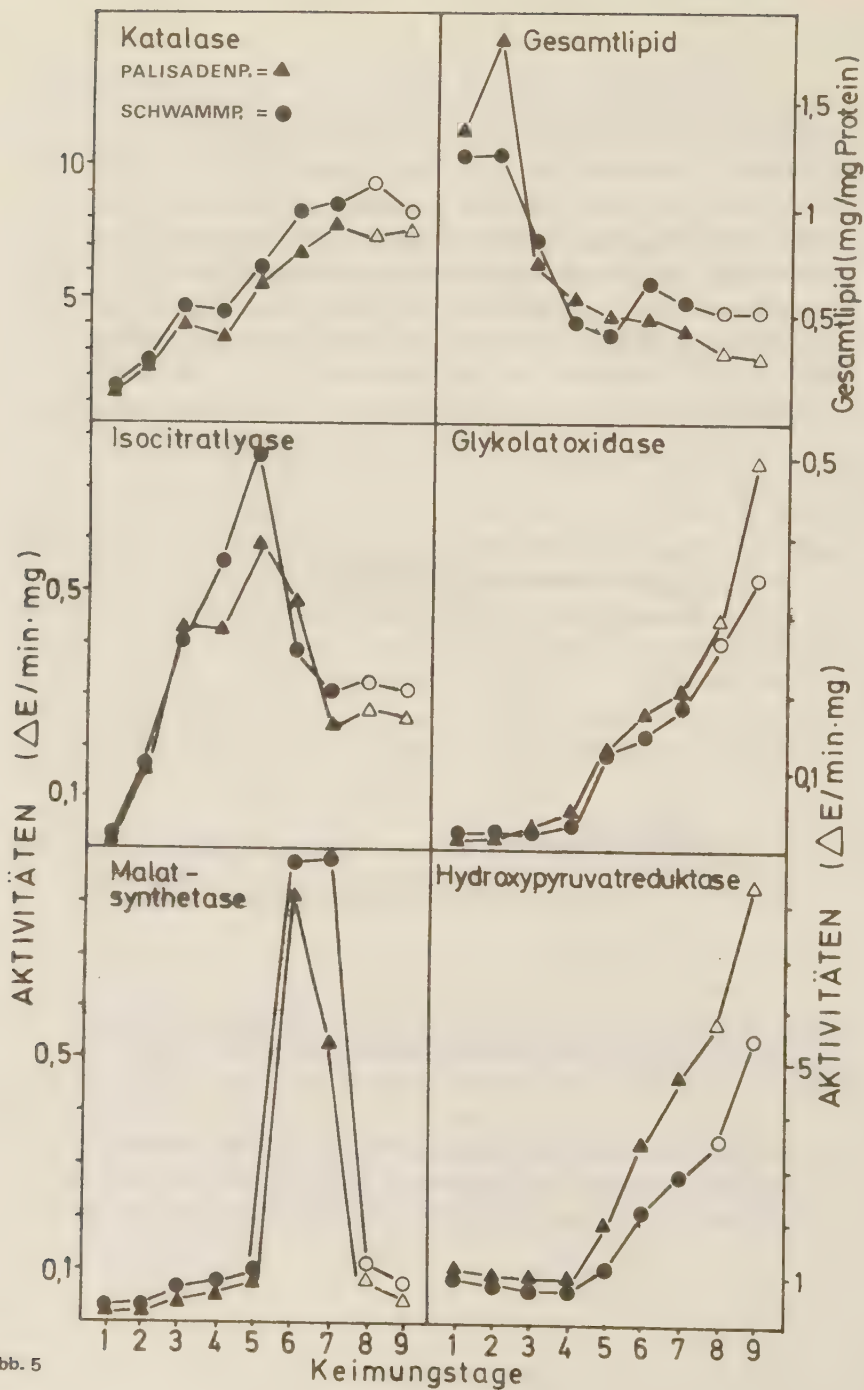


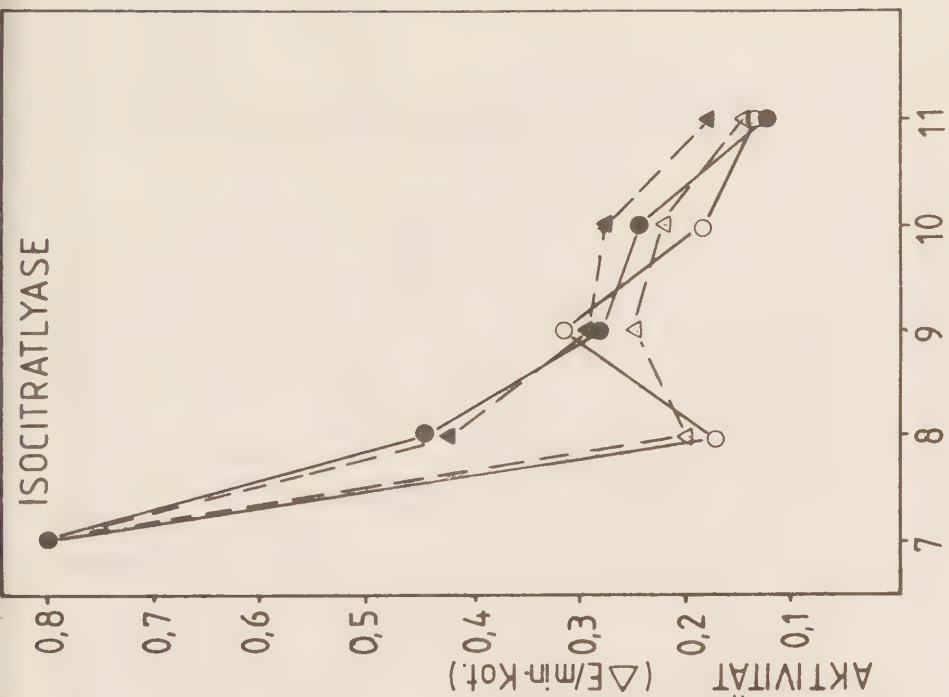
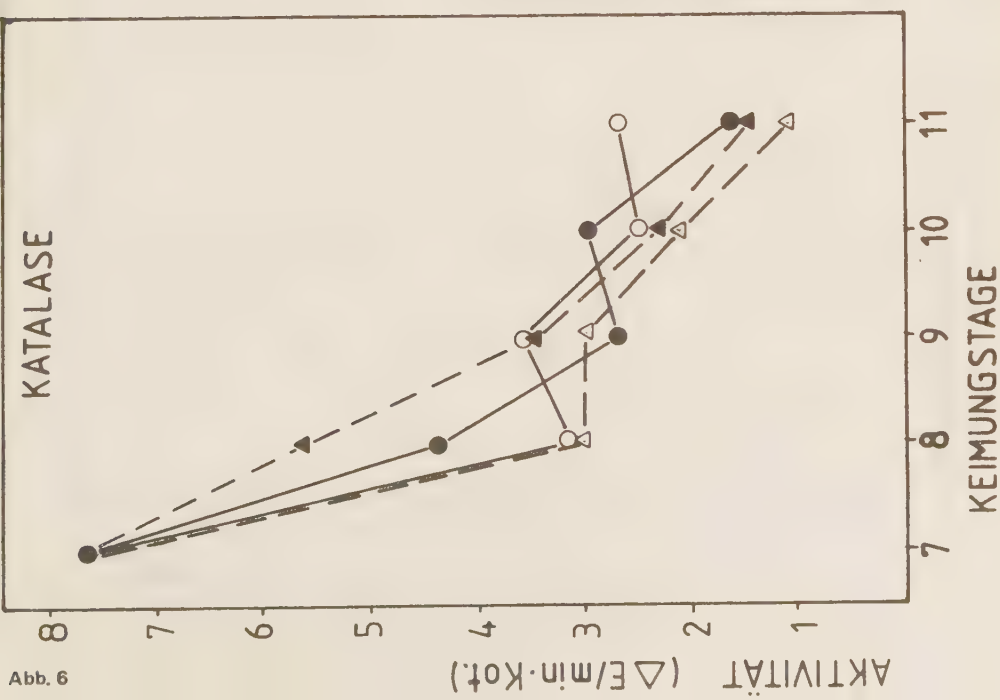
Abb. 5

Abnahme der extrahierbaren Gesamtlipide zeigt. Die Entwicklung des glyoxysomalen Enzymsystems ist, soweit es sich in den Aktivitäten der Leitenzyme Isocitratlyase und Malatsynthetase widerspiegelt, in den beiden Geweben in ihrem Verlauf und der Höhe der gebildeten Enzymaktivitäten vergleichbar. Diese Daten bestätigen die von Kagawa et al. (1973) gefundenen Resultate für die Gesamtkotyledonen. Sieben Tage nach Keimungsbeginn finden sich in beiden Geweben nur noch geringe Aktivitäten der glyoxysomalen Enzyme. Die Leitenzyme der Blattperoxisomen, Glykolatoxidase und Hydroxypyruvatreduktase nehmen auch in den Kotyledonen etiolierter Keimlinge vom 4. Keimungstag an in beiden Geweben stetig zu. Dabei sind allerdings ihre spezifischen Aktivitäten im Palisadenparenchym deutlich höher als im Schwammparenchym, obwohl letzteres einen niedrigeren Proteingehalt hatte. Andererseits erwiesen sich die spezifischen Aktivitäten der Katalase, die sowohl in den Glyoxysomen als auch in den Blattperoxisomen vorkommt, im Schwammparenchym stets höher als im Palisadenparenchym (Abb.5), wobei der Verlauf der Entwicklung keine Unterschiede zeigte. Eine Belichtung der Keimlinge vom 7. Tag nach Keimungsbeginn an wirkt sich, wie erwartet, in einer Beschleunigung der Zunahme der peroxisomalen Enzymaktivitäten aus.

Abb.5:

Verlauf der Entwicklung der Enzymaktivitäten im Palisadenparenchym bzw. Schwammparenchym von Wassermelonenkotyledonen im Dunkeln (Tage 0-7) und nach anschließender Belichtung (offene Symbole) am Tage 7 nach Keimungsbeginn.

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die kritische Phase der Funktionsänderung der Microbodies bei Wassermelonenkeimlingen etwa 7 Tage nach Keimungsbeginn einzutreten scheint. Um die Regulation dieser Microbody-Differenzierung zu untersuchen, wurde daher die Entwicklung der Enzymaktivitäten unter kontrollierten Bedingungen 3 Tage lang verfolgt. Dazu wurden 7 Tage alte etioliierte Keimlinge, denen die Wurzeln abgetrennt worden waren, mit den Hypokotylen in 10^{-4} M Kinetinlösung gestellt und 3 Tage im Dunkeln gehalten oder mit Weißlicht bestrahlt. Bei den Kontrollen wurde die Kinetinlösung durch destilliertes Wasser ersetzt. In den Abbildungen 6 und 7 ist der Verlauf der Enzymaktivitäten wiedergegeben. Wie schon für Sonnenblumenkotyledonen gezeigt wurde (Theimer et al., 1976) scheinen Kinetinabgaben in dieser hohen Konzentration das Verschwinden der glyoxysomalen Enzymaktivitäten Katalase und Isocitratlyase bei 7 Tage alten Wassermelonenkeimlingen nicht wesentlich zu hemmen; doch wie erwartet, steigert Belichtung den Verlust der Isocitratlyaseaktivität aus dem Gewebe. Die Entwicklung der Aktivitäten der peroxisomalen Leitenzyme Hydroxypyruvatreduktase und Glykolatoxidase wird sowohl durch Belichtung als auch durch Kinetinbehandlung im Dunkeln gegenüber den Dunkel- bzw. Wasserkontrollen erheblich gesteigert. Kinetin kann offensichtlich die Lichtwirkung im Dunkeln simulieren und wirkt bei gleichzeitiger Belichtung synergistisch. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen an Sonnenblumenkeimlingen (Theimer et al., 1976; Theimer et al., 1978a).



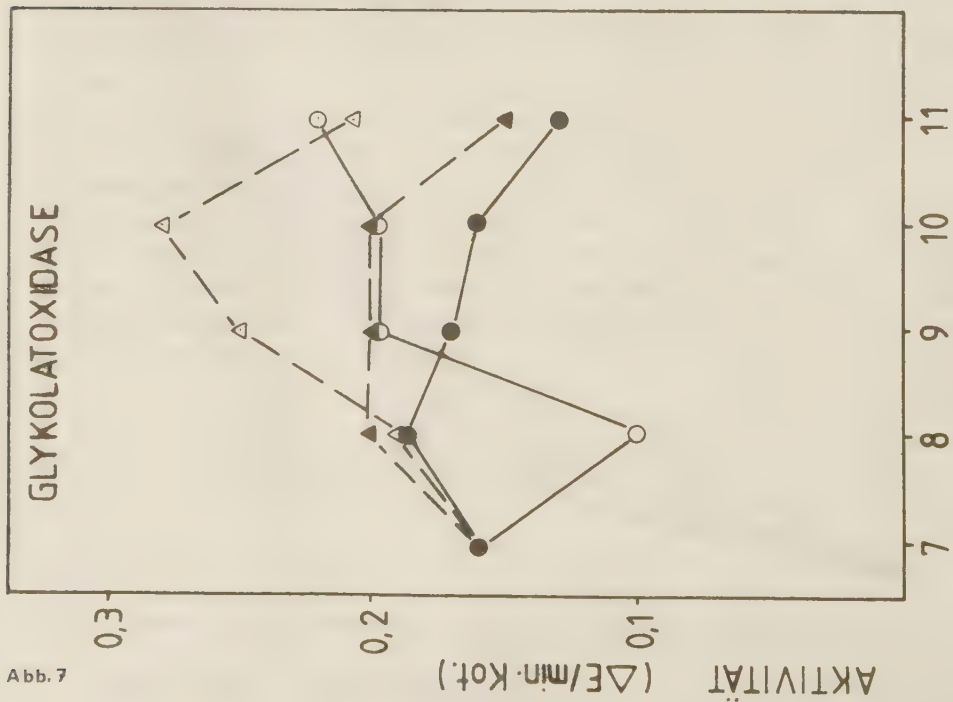
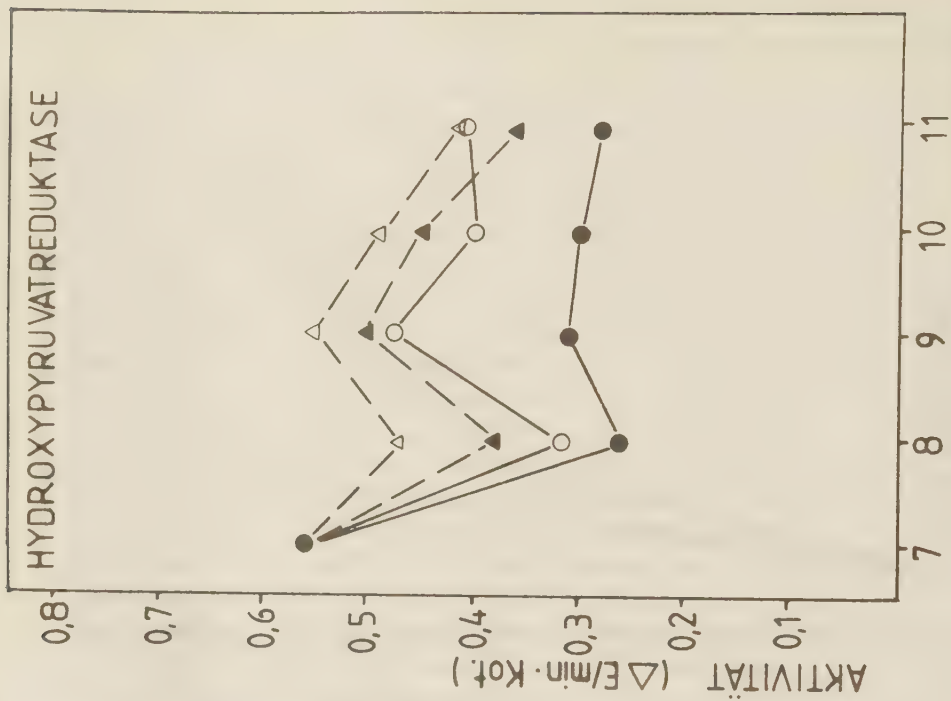


Abb. 7

2.2. Änderungen in Größe und Gestalt der Microbody- Profile in den Kotyledonen von Wassermelonen- keimlingen.

Gleichzeitig mit den enzymatischen Untersuchungen sollte die Microbody-Population in den Übergangsstadien von glyoxysomaler zu blattperoxisomaler Funktion auf morphologische Veränderungen hin untersucht werden; erste Hinweise für derartige lichtabhängige Gestaltveränderungen waren bereits von anderen Autoren für Gurken- bzw. Senfkeimlinge berichtet worden (Gruber et al., 1970; Schopfer et al., 1976). Mit Hilfe der DAB-Methode (Fahimi, 1969) kann die in den Microbodies vorkommende Katalaseaktivität cytochemisch nachgewiesen werden, so daß dann in den lichtmikroskopischen Präparaten die sonst hyalinen Organellen als kontrastreich schwarz gefärbte Microbodies klar zu erkennen sind (Bilder 18 A - 20 B). Die Kontrollen (Testansatz ohne Substrat H_2O_2 oder mit Aminotriazol als Katalasehemmstoff) bestätigen, daß tatsächlich das Microbody-Leitenzym Katalase und nicht eine unspezifische Peroxidase cytochemisch nachgewiesen wurde (Bild 21).

Abb. 6:

Verlauf der Entwicklung der Enzymaktivitäten Katalase und Isocitratlyase in Kotyledonen 7 Tage alter etiolierter Wassermelonenkotyledonen im Licht und im Dunkeln mit und ohne Kinetinbehandlung.

- = Dunkel, ○ = Dauerbelichtung,
- ▲ = Dunkel + Kinetinbehandlung,
- △ = Dauerbelichtung + Kinetinbehandlung.

Abb. 7:

Verlauf der Entwicklung der Aktivitäten von Glykolatoxidase und Hydroxypyruvatreduktase in Kotyledonen 7 Tage alter etiolierter Wassermelonenkeimlinge im Licht und im Dunkeln mit und ohne Kinetinbehandlung.

- = Dauerdunkel, ○ = Dauerbelichtung,
- ▲ = Dauerdunkel + Kinetinbehandlung
- △ = Dauerbelichtung + Kinetinbehandlung

Da die Wassermelonenkotyledonen so geschnitten wurden, daß jeweils ein Querschnitt durch ein ganzes Keimblatt erfaßt werden konnte, erlauben die Präparate für die Licht- und Elektronenmikroskopie eine Untersuchung der Microbody-Population des gesamten Mesophylls eines Kotyledos. Wie aus den Bildern 18 A - 20 B und 22 A - 25 hervorgeht, haben die Microbody-Profile unterschiedliche Größen, verschiedene Formen und sind nicht statistisch gleichmäßig über den Kotyledoquerschnitt verteilt. Daher wurden die Microbody-Profile für die Beschreibung ihrer Gestaltveränderungen in drei Größenklassen eingeteilt:

Größenklasse der Microbody-Profile	Bereich des größten Durchmessers
kleine	0.5 - 1 μm
mittlere	1 - 1.5 μm
große	1.5 - 3 μm

Ein recht auffallender Befund, der bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, ist der deutliche Größenunterschied der Microbodies des Palisadenparenchyms und des Schwammparenchyms. Wie Abb. 8 zeigt, finden sich in den Zellen des Palisadenparenchyms der Kotyledonen von Keimlingen, die im Dunkeln gehalten werden, über den gesamten beobachteten Entwicklungszeitraum von 3 Tagen nur kleine und mittlere Microbody-Profile (Bild 18 A, 22 A). Im Schwammparenchym solcher Kotyledonen treten überwiegend mittlere und große Microbody-Profile auf, deren Größe ebenfalls unverändert bleibt (Bild 18 B und 22 B). Im Gegensatz dazu kann man nach Belichtung der Keimlinge im Palisadenparenchym deutlich eine Abnahme der kugeligen Microbody-Profile mittlerer Größe beobachten (Abb.9). An deren Stelle treten vom 2. Tag im Licht an "längliche" Microbody-Profile mittlerer Größe auf, so daß die Gesamtzahl dieser

Abb.8-11:

Änderung der Anzahl von Microbody-Profilen unterschiedlicher Durchmesser (eingeteilt in 3 Kategorien: Durchmesser der Microbody-Profile a = 0.5-1 μm , b = 1-1,5 μm , c = 1.5-3 μm) im Palisaden- und Schwammparenchym der Kotyledonen 7 Tage alter etiolierter Wassermelonenseimlinge.

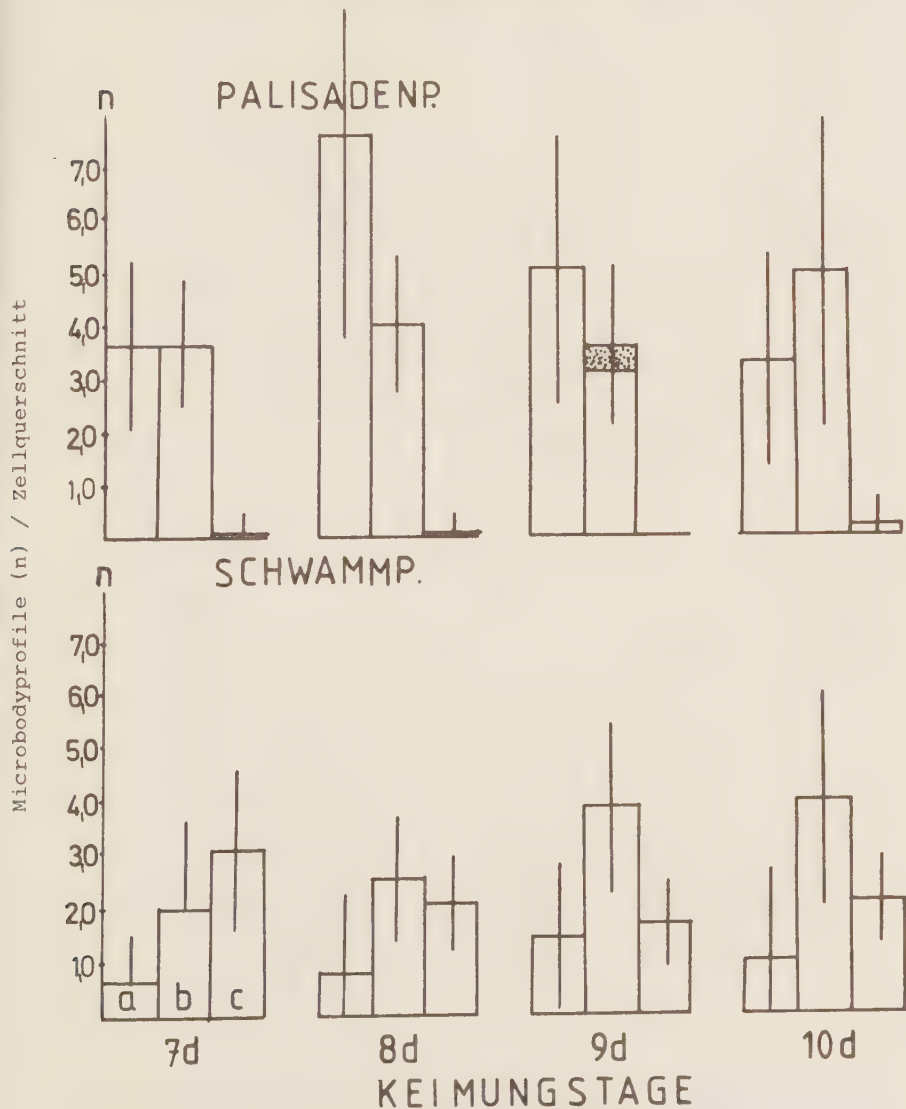


Abb.8:

Entwicklung im Dunkeln

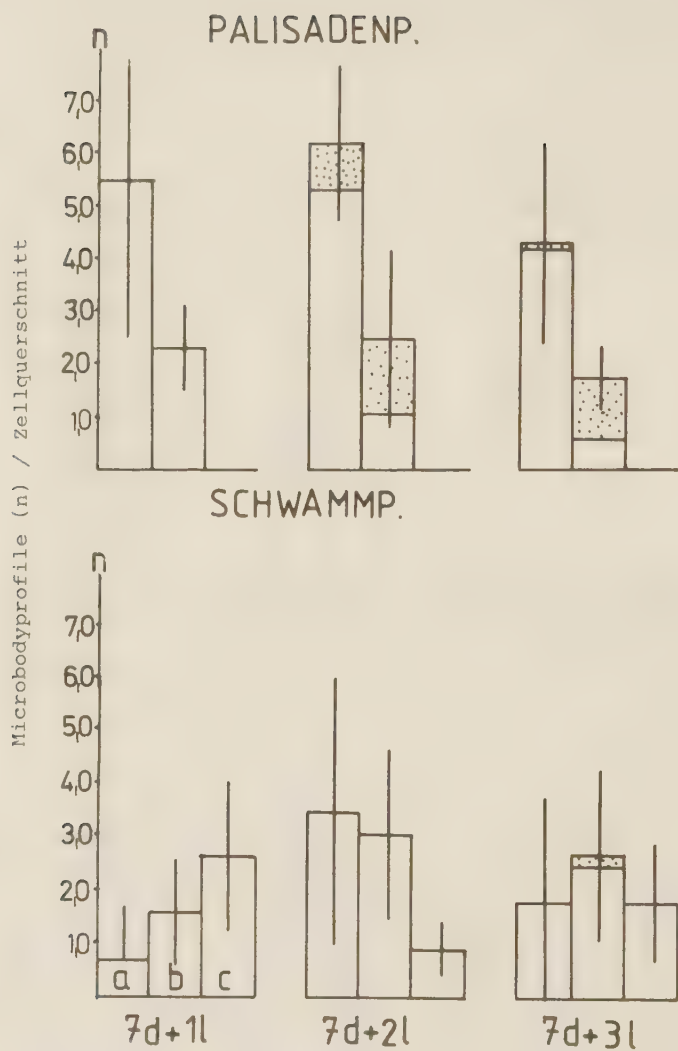


Abb.9:

Entwicklung bei Dauerbelichtung (gepunktete Kästchen = Anteil der "länglichen" Microbody-Profile, vgl. Text).

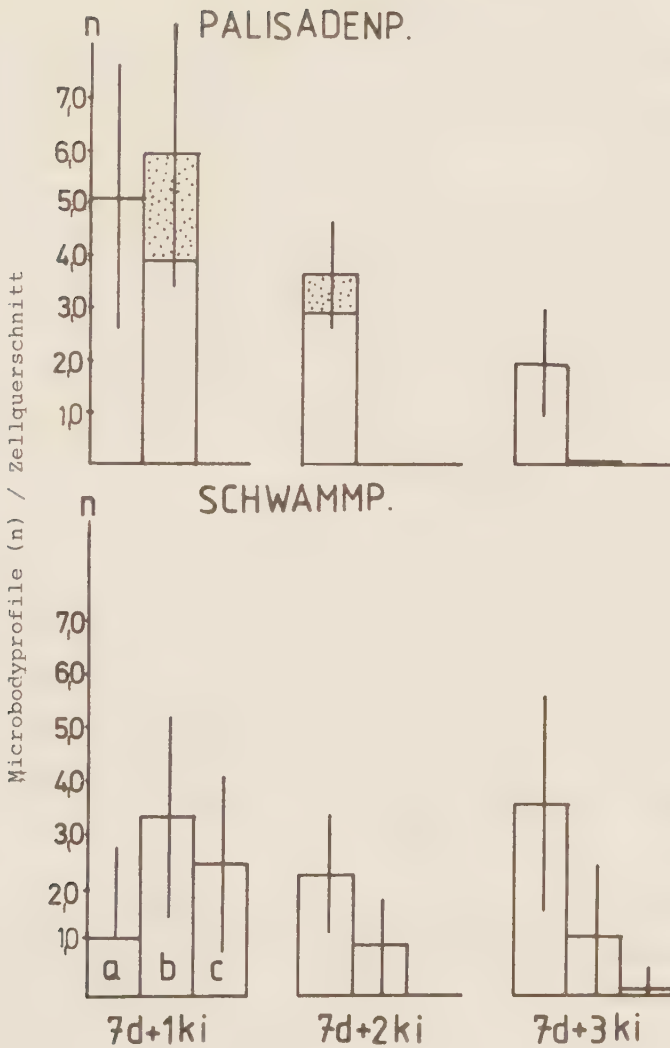


Abb.10:

Entwicklung im Dunkel bei gleichzeitiger Kinetin-behandlung.

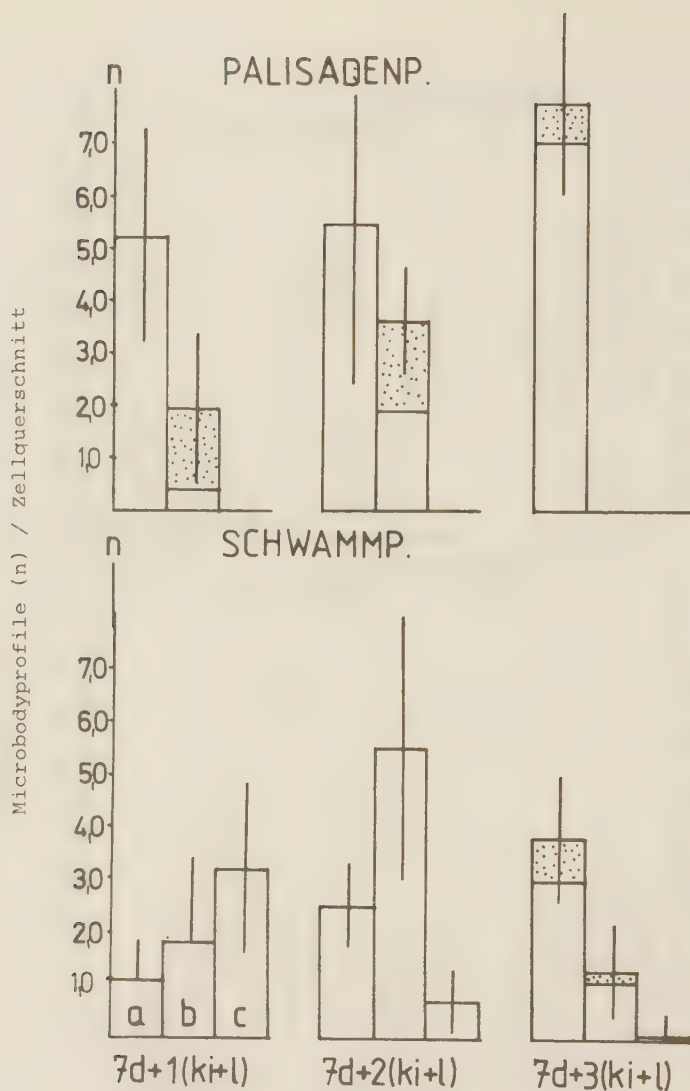


Abb.11:

Entwicklung bei Dauerbelichtung und zusätzlicher Kinetinbehandlung

Microbody-Kategorie im wesentlichen konstant bleibt. Im Schwammparenchym erfolgt vorwiegend eine Abnahme der großen sphärischen Microbody-Profile zugunsten der kleinen und mittleren (Bild 20 B). Längliche Formen liegen nur vereinzelt am 3. Tage nach Lichtbeginn vor (Bild 20 A).

Kinetinabgaben bewirken im Palisadenparenchym der Kotyledonen unbelichteter Keimlinge eine drastische Abnahme der Zahl der Microbody-Profile pro Zelle. Dabei erscheinen längliche Microbody-Profile mittlerer Größe bereits am 1. und 2. Tag nach Beginn der Behandlung. Im Schwammparenchym erfolgt, ähnlich wie nach Belichtung, eine Abnahme der großen Microbody-Profile vor allem zugunsten der kleineren (Abb.10).

Bei Belichtung mit gleichzeitiger Kinetinbehandlung der Keimlinge zeigen sich im Palisadenparenchym Veränderungen der Microbody-Profile, die auf eine synergistische Wirkung beider Parameter schließen lassen: neben der licht- bzw. kinetinbedingten Abnahme der Microbody-Profile mittlerer Größe finden sich längliche Microbody-Profile bereits am 1. Tag nach Beginn der Behandlung (Bild 19 A, 23, 24), was typisch für die Kinetinwirkung zu sein scheint (Abb.11). Im Schwammparenchym ist wiederum eine Zunahme der kleinen Microbody-Profile mit einer Abnahme der großen korreliert (Abb.11).

2.3. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Microbody-Population in Kotyledonen von Sonnenblumenkeimlingen.

Die physiologischen Veränderungen der Microbody-Population von Sonnenblumenkotyledonen im Dunkeln und im Licht (Schnarrenberger et al., 1971; Gerhardt, 1973) und mit und ohne exogener

Kinetinbehandlung (Theimer et al., 1976; 1978a) sind bereits eingehend untersucht worden und stehen mit den in dieser Arbeit dargelegten Daten für Wassermelonenkeimlinge (Abschnitt 2.1) in gutem Einklang. Zum weiteren Vergleich sollten daher die feinstrukturellen Veränderungen der Microbodies in Sonnenblumenkotyledonen untersucht werden, nachdem 5 Tage alte etioliierte Keimlinge unter definierten Bedingungen (Theimer et al., 1976) wie folgt behandelt wurden: Keimlinge, denen die Wurzeln abgetrennt worden waren, wurden wie beschrieben (Material und Methoden 2.) im Dunkeln bzw. im Licht 2 Tage lang mit 10^{-4} M Kinetin behandelt. Bei den Kontrollen wurde die Kinetinlösung wieder durch destilliertes Wasser ersetzt.

Da auf Grund der Dicke der Kotyledonen der Sonnenblumenkeimlinge nie Schwamm- und Palisadenparenchym gemeinsam fixiert und eingebettet werden konnten, geben die Bilder 26-30 jeweils nur ausgewählte typische Beispiele für die Veränderungen der Microbody-Profile in unterschiedlichen Proben dieser Gewebeschichten. Auch bei Sonnenblumenkeimlingen weisen die Zellen des Schwammparenchyms offensichtlich größere Microbody-Profile auf als die des Palisadenparenchyms (vergl. Bild 26 (PP) und 29 (SP)). Wie bereits für die Kotyledonen der Wassermelonenkeimlinge gezeigt wurde, unterliegen die Microbodies der Helianthuskotyledonen ebenfalls keinen Veränderungen in Struktur oder Zahl, wenn die etioliierten Keimlinge weitere 2 Tage im Dunkeln gehalten werden. Behandlung mit Kinetin im Dunkeln, welche die blattperoxisomalen Enzymaktivitäten in der Microbody-Population kräftig steigert (Theimer et al., 1976), bewirkt die Bildung traubenähnlicher Zusammenlagerungen der Microbodies, die einen Durchmesser bis zu 5 μ m erreichen können und meist nur an einem Ende des Zellquerschnittes gefunden werden (Bild 27). Einen praktisch identischen Effekt ruft Belichtung der Wasserkontrollen hervor. Zusätzlich dazu zeigen die vorher

kugeligen Microbodies in anderen Bereichen des Zellquerschnittes deutliche cytoplasmatische Invaginationen oder gar vakuolenartige Einschlüsse (Bild 29,30). Kinetinbehandlung mit gleichzeitiger Belichtung bewirkt, daß bis zu 71 % der Microbody-Profile Invaginationen aufweisen (Bild 28). Diese Zellen zeigten jedoch keine Microbody-"Trauben". Bei Sonnenblumenkotyledonen steigert Kinetin im Licht die biochemische Funktionsänderung der Microbodies, indem es das Verschwinden der glyoxysomalen Enzymaktivitäten nicht hemmt, aber die Bildung der blattperoxisomalen Enzymaktivitäten synergistisch mit dem Licht fördert; dies könnte das Fehlen der traubenartigen Microbody-Profile in diesen Proben erklären, da diese möglichen Zwischenstadien in der Entwicklung der Blattperoxisomen so schnell durchlaufen wurden, daß sie in den vorliegenden Untersuchungen nicht erfaßt werden konnten. Aus der schematischen Zusammenfassung (Abb.12) der Wirkungen von Licht und Kinetin auf die Feinstruktur der Microbodies geht aber hervor, daß ähnlich wie bei Wassermelonenkeimlingen auch bei Sonnenblumenkeimlingen der Funktionswandel der Microbody-Population von deutlich erfaßbaren Änderungen der Microbodystrukturen begleitet wird, die sowohl von Kinetin als auch von Licht in ähnlicher Weise gesteuert werden.

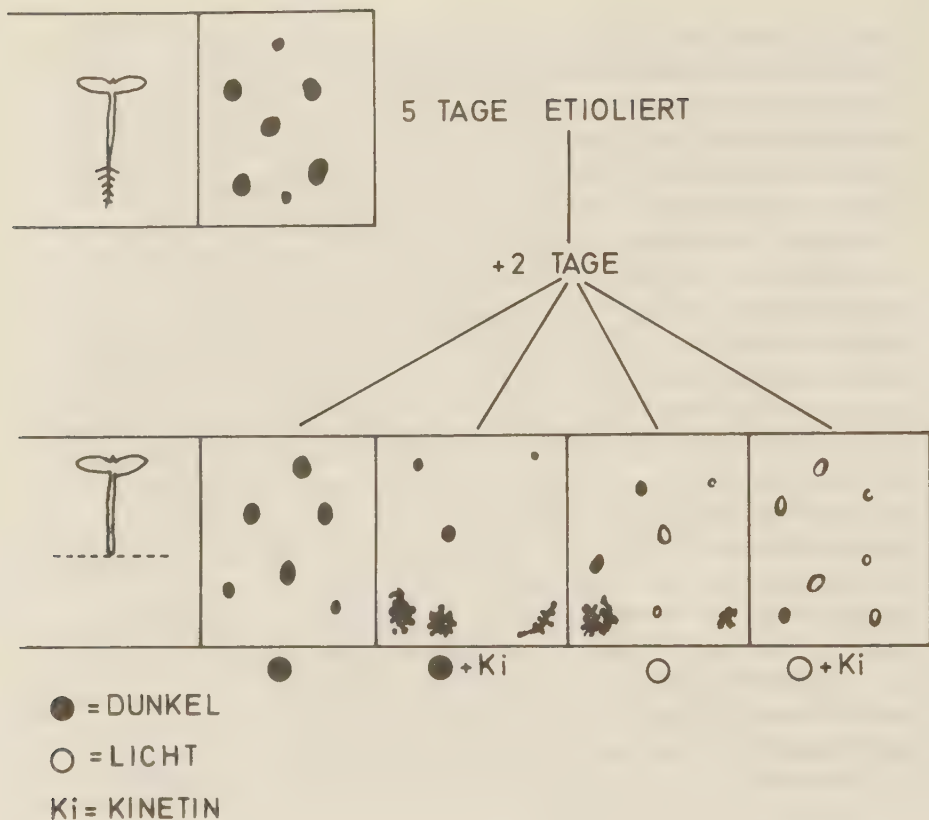


Abb.12:

Schematische Darstellung der Veränderung der Microbody-Population in Sonnenblumenmesophyllzellen bei Veränderung der Keimungsbedingungen 5 Tage alter etiolierter Keimlinge.

2.4. Feinstrukturelle Untersuchungen zum Mechanismus der Funktionsänderung der Microbodies

Die bisher dargelegten Versuchsergebnisse schließen weder eine de novo Synthese von Peroxisomen ganz aus, noch erbrachten sie eindeutige Beweise für eine Umwandlung der Glyoxysomen in Blattperoxisomen. Bei beiden Alternativen stellt sich jedoch die Frage, wie eventuell neu gebildete peroxisomale Enzymaktivitäten in die neue Microbody-Population der Zellen gelangen. Die Microbodies selbst besitzen keine Ribosomen in ihrer Matrix und sind daher nicht zur Proteinsynthese befähigt (Gerhardt und Beevers, 1970). Falls aber die neuen Enzyme außerhalb der Grenzmembran der Microbodies synthetisiert werden, müßte es einen Mechanismus geben, mit dessen Hilfe sie anschließend an ihren späteren Wirkungsort im Organell transportiert werden. Dazu werden heute im wesentlichen zwei Alternativen diskutiert:

Die Proteinsynthese könnte cytoplasmaseitig direkt an der einfachen Elementarmembran der Microbodies erfolgen, so daß Enzyme oder deren Untereinheiten in statu nascendi durch die Membran geschleust werden könnten. In diesem Fall sollte man in den Übergangsstadien Ribosomen an den Microbody-Membranen beobachten können; dies wurde für die äußere Membran von Hefemitochondrien einmal beschrieben (Kellems und Butow, 1972).

Die Proteinsynthese könnte aber auch an den Membranen des rauen ER stattfinden; dann könnte ein einschlägiger Membranbereich mit der Microbodymembran verschmelzen, so daß über diese Kontaktstelle die Enzymproteine transferiert würden.

Für die elektronenmikroskopische Präparation war es bei dieser Fragestellung besonders wichtig, Ribosomen und Polysomen gut zu erhalten. Bekanntlich kann durch Zugabe von MgCl_2 in höheren Konzentrationen (etwa 5 mM) zu allen Puffern das Zerfallen der Ribosomen in ihre beiden Untereinheiten verhindert und ihre Membranbindung erhalten werden (Bonner, 1960). Außerdem wurde durch eine Zwischenkontrastierung nach Kellenberger et al. (1958) eine kontrastreiche Darstellung der Ribosomen in den elektronenmikroskopischen Präparaten gesichert. Trotz dieser Vorkehrungen konnten im Cytoplasma nur wenige Polysomen beobachtet werden. Deshalb wurden in den Übergangsstadien einige Sonnenblumenkeimlinge vor dem Fixieren ca. 16 Stunden lang mit einer $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Lösung von Cycloheximid behandelt, das als Hemmstoff der Proteinsynthese an 80S Ribosomen gilt (Vazquez, 1974). Nach Taska und Hillman (1970) soll es dabei die Ablösung der Ribosomen von der m-RNS verhindern und somit die Polysomen "konservieren". Wie aus Bild 31 hervorgeht, findet sich in Zellen der mit Cycloheximid behandelten Kotyledonen tatsächlich ein wesentlich höherer Anteil an Polysomen im Cytoplasma als in den Wasser-Kontrollen (Bild 32). Mit dieser Methode wurden Kotyledonen etiolierter Sonnenblumenkeimlinge verschiedenen Alters (0-7 Tage) sowie in den kritischen Entwicklungsstadien nach Belichtung bzw. Kinetinbehandlung genau auf, an Microbodymembranen angeheftete Ribosomen hin untersucht. Doch in allen untersuchten Präparaten waren die Microbodymembranen stets frei von Ribosomen (Bilder 33, 35); auch wurden nie mit Ribosomen besetzte Grenzmembranen von Plastiden oder Mitochondrien entdeckt, was gegen eine Verallgemeinerung der an einem Mikroorganismus gemachten Beobachtung spricht (Kellems und Butow, 1972). Dagegen war das ER in den untersuchten Proben durchaus oft reichlich mit Ribosomen besetzt (Bild 34). Dies entkräftet den Einwand, daß sich die Ribosomen bzw. Polysomen während der Präparation von den Membranen (speziell Microbodymembranen) abgelöst haben könnten.

Da in allen elektronenmikroskopisch untersuchten Schnitten auch von Raps und Wassermelonen, nie der geringste Anhaltspunkt für eine Proteinsynthese direkt an den Microbodies gefunden worden war, wurden Präparationen in den kritischen Entwicklungsstadien deshalb nach Kontakten zwischen Microbodies und ER-Membranen untersucht. In einzelnen Fällen konnten tatsächlich Verbindungen des ER mit Microbodies beobachtet werden, die jeweils als lokale Fusion des Lumens eines Microbody's mit dem eines ER-Stranges erscheinen (Bilder 33, 35). Die geringe Häufigkeit des Auftretens solcher Kontakte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen könnte durch die geringe Wahrscheinlichkeit erklärt werden, die dafür besteht, in einem Ultradünnschnitt (ca. 500 Å dick) eine lokale Verbindung eines Microbodies (ca. 20 000 Å Durchmesser) mit einem Strang des ER (ca. 2000 Å Durchmesser) zu treffen.

Außerdem wurden bei der Untersuchung der Wassermelonen- und Sonnenblumenkotyledonen gelegentlich direkte Verbindungen des ER sowohl mit Mitochondrien (Bild 36) als auch mit Chloroplasten (Bild 37) beobachtet. In Bild 36 erkennt man deutlich, daß das ER seine Fortsetzung direkt in der äußeren Mitochondrienmembran findet (vergleiche ER-Verbindungen bei *Neurospora crassa* "slime", Abschnitt II, 3). Diese Beobachtungen weisen ebenfalls darauf hin, daß in den Kotyledonen eher solchen Kontakten eine physiologische Rolle bei der Differenzierung der Zellen und ihrer Organellen zukommt als der Anheftung von Ribosomen an die Organellmembran (Kellems und Butow, 1972).

II. Differenzierung der Zellen der Neurospora crassa "slime"

Mutante

Zellen von *Neurospora crassa* sind eukaryontische Mikrobenzellen, in welchen die Enzymaktivitäten, die in höheren Pflanzenzellen in Microbodies lokalisiert sind und z.B. durch Licht und Phytohormone gesteuert werden, durch Substrate regulierbar sind (Duntze et al., 1969; Flavell und Woodward, 1970). Es sollte daher an diesem Modellfall versucht werden, zu klären, ob durch Substrate ähnliche feinstrukturelle Veränderungen, insbesondere der Microbodies, induziert werden können, wie sie für Mesophyllzellen gezeigt wurden. Bisher gibt es für Pilzzellen im allgemeinen und für *Neurospora crassa* im besonderen nur wenig Information darüber, ob sich bei solchen Substratänderungen auch die Ultrastruktur der Zelle ändert (Vigil, 1973; Maxwell et al., 1975). Um ein Bezugssystem zu erhalten, wurde zunächst die Feinstruktur der Zellen in der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase einer Kultur untersucht. Dabei wurde eine zellwandlose "slime"-Mutante verwendet, um die Schwierigkeiten zu umgehen, welche die Zellwand der Pilzzellen beim Fixieren und cytochemischen Enzymnachweis bereitet (Maxwell et al., 1975).

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Entwicklung einer Zellkultur von Neurospora crassa "slime".

In den ersten 10 Stunden nach dem Animpfen der Submerskultur in Saccharosemedium vermehren sich die Zellen rasch (Wanner, 1974) und bilden kleine Zellgruppen. Der Durchmesser der Einzelzellen liegt zwischen 10 und 40 μm (Bild 38). In den nächsten 10 Stunden trennen sich die Zellgruppen, wobei die Zellen an Größe zunehmen (Durchmesser 50-150 μm). In dieser Phase können von den Zellen ausgehende föhlerartige Cytoplasma-

Auswüchse beobachtet werden, die nach Sekunden bis Minuten wieder eingezogen werden können, um z.T. an einer anderen Stelle wieder ins Medium vorzudringen (Bild 39). In 36 Stunden alten Pilzkulturen nehmen die Zellen kaum mehr an Größe zu und zeigen bereits kleine Vakuolen. Nach diesem Zeitraum beginnt die stationäre Wachstumsphase mit zunehmender Vakuolisierung der Zellen (Bild 40) und darauffolgender Autolyse, die ca. 70 Stunden nach dem Animpfen einsetzt.

2. Ultrastrukturelle Veränderungen

2.1. Kerne

In jedem Stadium der Entwicklung der Zellkulturen sind die Zellen polyenergisch (Bilder 41, 50). Die Zahl der Zellkerne pro Zellquerschnitt liegt zwischen 5 und 25. Sie erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild rundlich, mit einem Durchmesser von etwa $1,5\ \mu\text{m}$ und einem gut kontrastierten Nukleolus; sie zeigen keine wesentlichen strukturellen Veränderungen im Verlauf des Wachstums der Submerskultur.

2.2. Mitochondrien

Dagegen unterscheiden sich die Mitochondrien aus Zellen verschiedenen Alters in Gestalt und Ausbildung der Cristae. Dabei kann man im wesentlichen drei elektronenmikroskopisch unterschiedliche Stadien unterscheiden:

- a) In der überwiegenden Zahl der Zellen einer 16 Stunden alten Pilzkultur sind die Mitochondrien annähernd kreisförmig im Profil, mit einem Durchmesser von $0,5\text{--}0,8\ \mu\text{m}$. Die Cristae sind ungeordnet und kurz.
- b) Auf dieses Stadium folgt eine Wachstumsphase (16 bis 24 Stunden nach dem Animpfen), in welcher Zellen vorherrschen, deren Mitochondrien in den elektronenmikroskopischen

Präparaten als längliche Gebilde vorliegen, die als Charakteristikum oft hantel-förmig verdickte Enden aufweisen. In dieser Phase sind die Cristae meist parallel zueinander angeordnet (Bild 41).

- c) Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase besitzen meisten Zellen Mitochondrien, die deutlich langgestreckt sind, und deren Cristae regelmäßig in 4-5 parallelen Lagen angeordnet sind. Die Länge der Mitochondrienprofile ist in diesem Stadium maximal und kann bis zu 2 μm betragen.

Die Anordnung der Mitochondrienprofile in diesen Zellschnitten legte die Vermutung nahe, daß in diesem Zustand die Mitochondrien nicht als viele einzelne Organellen, sondern als wenige größere Einheiten vorliegen. Daher wurde durch ein Aufeinanderprojizieren aller sich auf 14 Serienschnitten überlappenden Mitochondrienprofilen versucht, Aufschluß über die dreidimensionale Struktur der Mitochondrien innerhalb der Zelle zu erhalten. Die Zonen, die durch eine durchgehende Linie begrenzt sind (Abb.13), spiegeln ein aus dem räumlichen Zusammenhang vieler Mitochondrienprofile rekonstruiertes Mitochondrium wider. Dieses Projektionsbild eines kleinen Ausschnittes einer Neurospora-Zelle kann bei Extrapolation auf die ganze Zelle als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, daß nicht viele "kleine" Mitochondrien isoliert vorliegen, sondern daß vielmehr eine Zelle einige große, "netzartige" Mitochondrieneinheiten besitzt. Diese Beobachtungen decken sich mit Befunden an Chlamydomonas (Arnold et al., 1972) und Hefen (Davison und Garland, 1977). Für ein derartiges "mitochondriales Retikulum" kann postuliert werden, daß es sich in seiner dreidimensionalen Struktur in Abhängigkeit des Zellalters - wie die Veränderung der Mitochondrienprofile ja zeigt - mitverändert. In welcher Weise die beschriebenen feinstrukturellen Veränderungen der Mito-

chondrien mit physiologischen Funktionsänderungen korreliert werden können, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

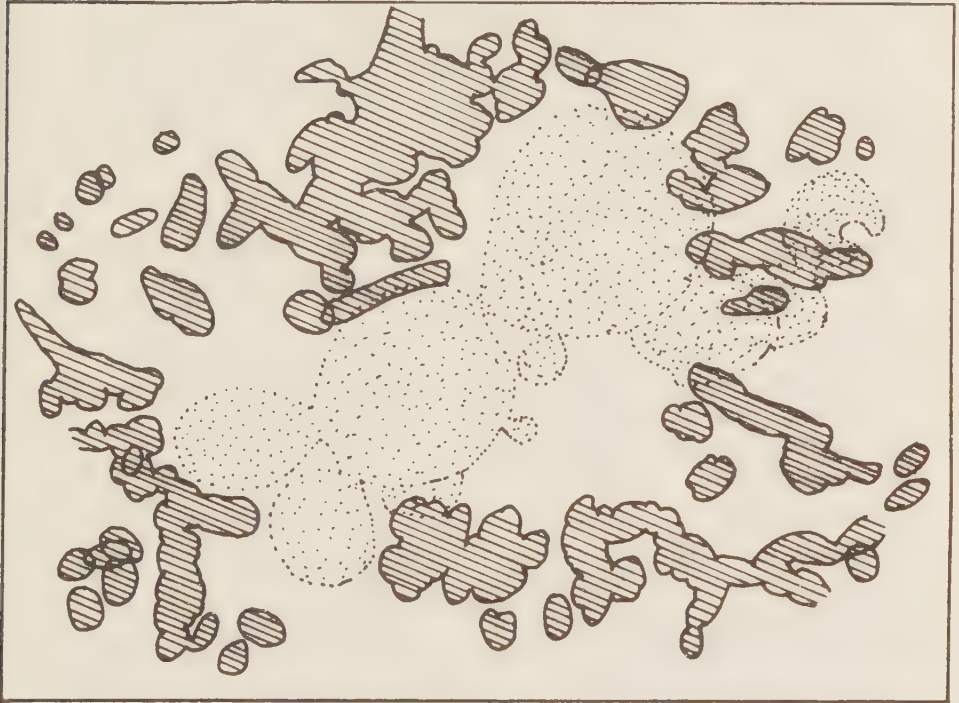


Abb.13:

Projektionsmodell eines "Mitochondrien-Systems" einer *Neurospora crassa* "slime"-Zelle - rekonstruiert aus überlappenden Mitochondrienprofilen von 14 Serienschnitten. (Gepunktet ist die Lage eines Microbodies Typ b wiedergegeben, vgl. Bilder 48 A-49).

2.3. Endoplasmatisches Retikulum und Sphärosomen

2.3.1. Reduktion des ER

Die Ausbildung des ER der *Neurospora crassa* "slime"-Zellen ist deutlich altersabhängig. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen einer 16-20 Stunden alten Pilzkultur zeigen ein massiv ausgeprägtes Membransystem des ER (Bild 41). Es kann sogar aus vielen Membranlagen aufgebaute Spiralen bilden (Bild 64). Wie die Bilder 66 und 67 zeigen, wurde sowohl glattes als auch rauhes ER in den Zellpräparaten vorgefunden, wobei an einem durchgehenden Strang sowohl Abschnitte dicht mit Ribosomen besetzt, als auch längere Abschnitte völlig frei von Ribosomen sein können. Im Gegensatz dazu zeigen elektronenmikroskopische Bilder von Zellen aus älteren Pilzkulturen nur wenige Membranstränge im Cytoplasma (Bild 50). Allerdings könnte die elektronenmikroskopische Präparation weniger, zufällig ER-armer Zellen die vermeintliche Rückbildung des Endomembransystems in Zellen von Pilzkulturen vortäuschen, welche das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreichen. Daher wurde die Aktivität der Cytochrom-c-Reduktase, die allgemein als Leitenzym des ER gilt (Schulz und Staudinger, 1975), in Zellhomogenaten von 20 bzw. 46 Stunden alten Pilzkulturen verglichen. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, findet man in Rohhomogenaten von Zellen 46 Stunden alter Pilzkulturen nur etwa die Hälfte der Aktivität an Cytochrom-c-Reduktase der Zellen 20 Stunden alter Kulturen. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich für die Rohpartikelfractionen. Besonders deutlich zeigt sich das Verschwinden des ER-Leitenzyms aber in den Mikrosomalfractionen, wo in 46 Stunden alten Kulturen weniger als 20 % der Enzymaktivität 20 Stunden alter Pilzkulturen erhalten bleibt. Der Befund, daß der überwiegende Anteil dieser Enzymaktivität mit den Rohpartikelfractionen sedimentierte, könnte teils dadurch erklärt werden, daß in Pilzzellen dieses Enzym auch in der Kern- bzw. Mitochondrienmembran vorkommt oder auf eine Kontamination dieser Fractionen mit Membranen des ER zurückzuführen sein.

Tab.1: Verteilung der Aktivitäten der Enzyme Cytochrom-c-Reduktase und Cytochrom-c-Oxidase nach den einzelnen Schritten der differentiellen Zentrifugation des Rohhomogenates.

Cytochrom-c-Reduktase		
Zellfraktion	Enzymaktivität (E/min · g Naßgewicht)	
	<u>20^h Kultur:</u>	<u>46^h Kultur:</u>
2 000 g Überstand ÜI	22.8	9.0
12 000 g Überstand ÜII	4.25	2.5
12 000 g Sediment SII	10.2	6.2
23 000 g Überstand ÜIII	3.36	1.5
23 000 g Sediment SIII	0.6	0.36
130 000 g Überstand ÜIV	1.6	0.9
130 000 g Sediment SIV	<u>0.75</u>	<u>0.13</u>
(Microsomalfraktion)		
Cytochrom-c-Oxidase		
2 000 g Überstand ÜI	3.57	4.05
12 000 g Überstand ÜII	0.79	0.28
12 000 g Sediment SII	3.2	4.28
130 000 g Überstand ÜIV	0.0	0.0
130 000 Sediment SIV	<u>0.0</u>	<u>0.0</u>

In der Tat zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Rohpartikelfraktion membranöse Fortsätze der äußeren Mitochondrienmembran, die als Abschnitte des ER gedeutet werden könnten (Bilder 57-60). Im Vergleich dazu treten in den Roh-

partikelfractionen von Zellen verschieden alter Pilzkulturen keine wesentlichen Veränderungen des mitochondrialen Markerenzym Cytochrom-c-Oxidase auf, so daß z.B. die beobachteten Strukturveränderungen der Mitochondrien (s.oben) keinen Effekt auf dieses Enzym haben können. Zusätzlich zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die durch differentielle Zentrifugation aus Zellhomogenaten von verschiedenen alten Pilzkulturen gewonnenen Microsomalfraktionen im Elektronenmikroskop auf ihre Zusammensetzung und Reinheit hin überprüft. Ein Vergleich der Bilder 55 und 56 zeigt deutlich, daß die Microsomalfraktion von Zellen einer 20 Stunden alten Kultur neben Ribosomen auch viele Membranen bzw. kleine Membranvesikel enthält; sie ist sehr homogen und ist weder durch ganze Zellorganelle noch durch größere Organellbruchstücke kontaminiert (Bild 55). Dagegen ist in der Microsomalfraktion aus Zellen einer 46 Stunden alten Kultur der Anteil an Membranmaterial sehr viel geringer; sie besteht zum überwiegenden Teil aus Ribosomen (Bild 56). In beiden Fraktionen können die Membranen z.T. mit Ribosomen besetzt sein (Pfeile), was ein zusätzlicher Hinweis darauf ist, daß in diesen Microsomalfraktionen Membranen des endoplasmatischen Retikulums enthalten sind. Diese biochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde zeigen somit übereinstimmend, daß bereits gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase das Endomembransystem der Zellen von *Neurospora crassa* "slime" sehr stark reduziert wird.

2.3.2. Zunahme der Zahl der Sphärosomen

Beim Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Zellen junger und alter Pilzkulturen (Bilder 41 und 50) fällt auf, daß die Zahl der Sphärosomen in den Zellen mit zunehmendem Alter der Kulturen ansteigt. Wie schon für die fettspeichernden Strukturen in den Kotyledonen von Ölsamen gezeigt wurde, zeigt die Grenzmembran der Sphärosomen der

Neurospora crassa-Zellen auch bei höchster Auflösung nicht die typische dunkel-hell-dunkel Struktur einer Elementarmembran, sondern kann ebenfalls nur als eine dunkel erscheinende Linie erkannt werden, die wiederum etwa der "Hälfte" einer Elementarmembran entspricht. Die Sphärosomen treten frühestens in 20-24 Stunden alten Kulturen auf und liegen meist in kleinen Gruppen zusammen. Die zu diesem Zeitpunkt häufig beobachteten Verbindungen der "half unit membrane" kleinerer Sphärosomen mit den elektronendichten Schichten einer ER-Membran (Bilder 51-54) legen nahe, das ER als Bildungsort der Sphärosomen zu betrachten. Da außerdem die Zunahme der Zahl der Sphärosomen in den Zellen offensichtlich mit der einsetzenden Reduktion des ER zusammenfällt, könnten diese als "Speicherstrukturen" für die Lipide der ER-Membranen dienen.

2.4. Microbodies

2.4.1. Cytochemischer Nachweis zweier Microbody-Typen

Van Winkle (1969) deutete bereits das Vorkommen von Microbody-ähnlichen Strukturen im elektronenmikroskopischen Präparaten von Neurospora crassa "slime" an. Ihnen galt ein besonderes Interesse, da durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation von Zellhomogenaten der "slime"-Mutante Hinweise erarbeitet worden waren, die auf das Vorkommen von 2, zumindest in ihrer Enzymsausstattung verschiedenen Microbody-Typen schließen lassen (Theimer et al., 1978b).

So konnten praktisch in allen elektronenmikroskopisch untersuchten Zellquerschnitten Strukturen beobachtet werden, deren morphologische Eigenschaften in elektronenmikroskopischen Bildern identisch sind mit denen der als Microbody definierten Strukturen anderer eukaryontischer Zellen

(De Duve, 1969; Tolbert, 1971). Die sphärischen Organelle sind von einer einfachen Elementarmembran umgeben und besitzen eine feingranuläre Matrix (Bilder 42, 45, 46).

Da physiologische Versuche gezeigt hatten, daß Nc 1118 "slime" Katalaseaktivität besitzt (Theimer, 1973; Theimer et al., 1978b,) wurde mit Hilfe der DAB-Methode (Fahimi, 1969) die Lokalisierung dieser Enzymaktivitäten in der Zelle cytochemisch untersucht. Im Gegensatz zu allen bislang untersuchten eukaryontischen Zellen (Vigil, 1973; Frederick et al., 1975) kann man bei Nc 1118 eine DAB-positive Reaktion jedoch nur in einem Teil der Microbodies nachweisen, was darauf hindeuten würde, daß in den Zellen neben einer Katalase-haltigen Microbody-Population (hier Typ a genannt) eine weitere vorkommt, die keine Katalase enthält (Typ b). Wie die Bilder 41, 42 und 43 deutlich zeigen, findet sich der DAB-Niederschlag in Microbodies, welche ebenso wie die "ungefärbten" Microbodies gleichmäßig über den gesamten Querschnitt verteilt sind. Das Ausbleiben einer positiven Reaktion kann also nicht durch mangelndes Penetrieren des Nachweisreagenz vorgetäuscht sein. Allerdings ergeben sich mit dieser Nachweisreaktion gelegentlich auch gewisse andere Häm-haltige Enzyme, z.B. Cytochrom-c-Peroxidase positive Resultate, so daß meist auch die Mitochondrienmembranen ein Reaktionsprodukt aufweisen.

Da der cytochemische Nachweis von Katalase in Zellstrukturen auf der Oxydation von DAB mit H_2O_2 in einer vom Enzym katalysierten peroxidatischen Reaktion beruht (Fahimi, 1969), muß die Aktivität von in den Zellen ebenfalls anwesenden Peroxidasen möglichst vollständig ausgeschlossen werden. Dies erfolgt schon weitgehend dadurch, daß die Inkubation für den Katalasenachweis in stark alkalischem Medium (pH 9,7) durchgeführt wird. Üblicherweise zeigen Peroxidasen bei diesem pH-Wert keine Aktivität mehr

(Gregory, 1966). Dementsprechend konnte in Rohhomogenaten von *Neurospora crassa*-Zellen bei pH 9.7 weder mit Guajakol (George, 1953), noch mit Benzidin (Gregory, 1966) als Substrat die Aktivität einer Peroxidase nachgewiesen werden.

2.4.2. Eigenschaften und Regulation der beiden Microbody-Typen

2.4.2.1. Microbody-Typ a

Die cytochemisch unterscheidbaren Microbody-Typen besitzen auch eindeutig verschiedene ultrastrukturelle Eigenschaften. Microbody-Typ a, der keine Katalaseaktivität zeigt, besitzt stets rund bis eiförmige Gestalt, mit einem Durchmesser von 0.2 - 0.5 μm . Anzahl und Größe dieser Microbodies bleiben in den elektronenmikroskopischen Präparationen von Zellen der Submerskultur in Vollmedium in den einzelnen Wachstumsphasen offensichtlich konstant (Bilder 41 und 50). Außerdem zeigt dieser Microbody-Typ gelegentlich hexagonale, homogen und strukturlos erscheinende Einschlüsse (Bild 45), die für den *Neurospora crassa* Wildtyp bereits früher beschrieben wurden und aus Ergosterin (Tsuda und Tatum, 1961) oder Protein (Hoch und Maxwell, 1974) bestehen sollen. Sie entsprechen in ihrer Struktur den "Woronin-bodies" verschiedener Pilze (Wergin, 1973; Allen, 1976), über deren Funktion bislang keine genauen Angaben existieren.

2.4.2.2. Microbody-Typ b

Microbody-Typ b reagiert auf den cytochemischen Katalasenachweis positiv. Größe, Form und Anzahl dieser Microbodies scheinen vom Entwicklungszustand der Zelle abzuhängen. In Zellen aus 16-20 Stunden alten Kulturen besitzen sie ebenfalls angenähert runde Gestalt mit einem Durchmesser von 0.2-0.5 μm (Bild 43). In elektronenmikroskopischen Präparaten von Zellen aus älteren Pilzkulturen findet man DAB-positive

Microbody-Profile, die offensichtlich größeren Durchmesser besitzen, häufig sichelförmige Gestalt aufweisen und sehr häufig in engem Kontakt mit kleineren Vakuolen stehen (Bilder 44, 46, 47). In Zellen aus Kulturen, welche sich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase befinden, erreichen diese Microbodies ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe und treten in engsten Kontakt zu den ebenfalls stark vergrößerten Vakuolen (Bild 50). Schließlich scheinen Microbody und Vakuole zu verschmelzen, da man in diesen Stadien häufig das DAB-Reaktionsprodukt in größeren Vakuolen findet (Bild 50). Die Abbildung 14 gibt schematisch den Entwicklungsverlauf des Microbody-Typ b wieder.

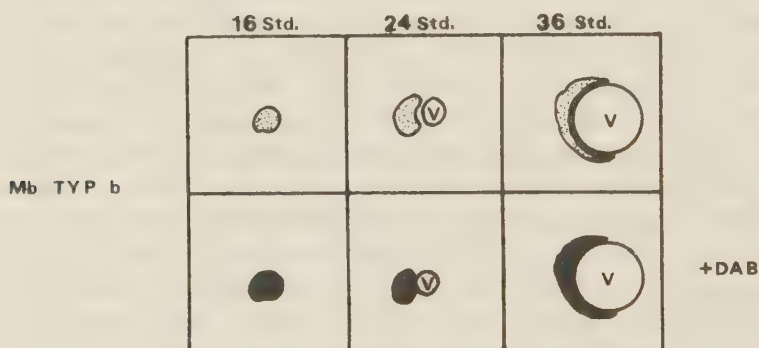


Abb.14:

Schematische Darstellung eines Microbodies Typ b in verschiedenen Entwicklungsstadien einer *Neurospora crassa* "slime"-Zelle.

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Bilder von 14 aufeinanderfolgenden Ultradünnschnitten einer Zelle, die einer Pilzkultur in der späten logarithmischen Wachstumsphase entnommen wurde, konnte eine dreidimensionale Rekonstruktion

eines Teiles eines DAB-gefärbten "Riesen"-Microbodies angefertigt werden (3 der Serienschritte zeigen die Bilder 48 A,B,C). Dieses naturgetreue Modell (Bild 49) zeigt ein durch Knospen, Einschnürungen und Invaginationen charakterisiertes "Microbody-System". In den Invaginationen sind dabei die Membranen der Vakuolen offensichtlich so dicht der Microbody-Membran angelagert, daß sie in den Bildern nur noch z.T. aufgelöst werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die in diesem Zustand der Zellentwicklung Katalase-haltigen Microbodies, zumindest teilweise, mit den Vakuolen fusionieren. Zweifellos aber lassen die durchgeführten Untersuchungen weiterer Serienschritte solcher Zellen aus älteren Pilzkulturen von *Neurospora crassa* "slime" den Schluß zu, daß in diesen Entwicklungsstadien stets mehrere der im Einzelbild getrennt liegenden Microbodies vom Typ b (Bilder 48 B und 50) in einem direkten räumlichen Zusammenhang stehen (s. auch Mitochondrien 2.2).

2.5. Verbindungen der Zellorganellen mit dem ER

Untersucht man elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen "junger" *Neurospora crassa* "slime" Kulturen auf Verbindungen zwischen Membranen des ER mit den Zellorganellen, so findet man Kontaktstellen mit allen besprochenen Organellen:

Die Bilder 61-63 und 65 zeigen Verbindungen mit Zellorganellen, die von einer doppelten Elementarmembran begrenzt werden; dabei besteht nur ein Kontakt mit der äußeren Membran z.B. eines Zellkerns oder eines Mitochondriums, die an der Kontaktstelle direkt in das ER übergeht (Bilder 61-63 und 65).

Bei Verbindungen des ER mit Zellorganellen, die durch eine einfache Elementarmembran begrenzt sind, wie z.B. Microbody-

Typ a (Bilder 66, 67) oder Typ b (Bild 68) oder Vakuolen (Bild 69) besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Matrix des Organells und dem Lumen des ER-Stranges. Außerdem finden sich auch Kontakte des ER mit dem Plasmalemma, so daß in diesem Fall das Lumen des ER mit dem extrazellulären Medium in Verbindung stehen kann (Bild 70). Derartige Verbindungen des ER mit den Zellorganellen und -strukturen fehlen allerdings in Zellen aus älteren Pilzkulturen praktisch völlig. Wie Bild 71 zeigt, kann ein Microbody über einen ER-Strang mit einem Sphärosomen verbunden sein.

3. Ultrastrukturelle Veränderungen der Zellen als Funktion der Kohlenstoffquelle im Nährmedium.

Wenn Glucose im Kulturmedium von *Neurospora crassa* durch C_2 -Verbindungen als einziger Kohlenstoffquelle ersetzt wird, lassen sich die Enzymaktivitäten des Glyoxylsäurezyklus induzieren, die in *Neurospora crassa* zumindest teilweise in Glyoxysomen lokalisiert sind (Kobr et al., 1969; Theimer, 1973; Theimer et al., 1978 b). Deshalb galt den Microbodies ein besonderes Augenmerk in der elektronenmikroskopischen Betrachtung.

Morphologisch zeigen die Microbodies (Typ a + b) bei Substratwechsel keine signifikanten Unterschiede, jedoch scheint die Zahl der Microbodies von Typ a von der Art der Kohlenstoffquelle abzuhängen.

Wie die Tabelle 2 zeigt, reagieren die Pilzzellen bei einer Substratänderung mit einer Vergrößerung der Zahl der Microbodies vom Typ a, nicht aber vom Typ b. Da unter diesen Bedingungen nur die Enzymaktivitäten des Glyoxylsäurezyklus, nicht aber Katalase und Uricase auf ein Vielfaches zunehmen (Theimer et al., 1978b), weisen diese Be-

funde ebenfalls darauf hin, daß die beiden Microbody-Typen tatsächlich 2 verschiedenen Populationen angehören, die getrennt reguliert werden.

Tab.2: Abhängigkeit der Microbody(-Typ a)-Populationsgröße von der Kohlenstoffquelle des Nährmediums.

Nährmedium	Microbodyprofile (Typ a)
	μm^2 Schnittfläche
Saccharosemedium	0.03 ± 0.01
Methanolmedium	0.06 ± 0.01
Äthanolmedium	0.08 ± 0.04

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der Feinstruktur zweier unterschiedlicher eukaryontischer Zelltypen untersucht, welche im Verlauf einschneidender Differenzierungsvorgänge der Zellen die biochemischen Abläufe begleiten. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei zwei, nicht zur eigenen Proteinsynthese befähigten Zellkompartimenten geschenkt, nämlich den Sphärosomen und den Microbodies. Außerdem erbringen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen auch neue wichtige Hinweise, daß das endoplasmatische Retikulum nicht nur in tierischen Zellen (Morré et al., 1974), sondern auch bei so unterschiedlichen pflanzlichen Zelltypen wie *Neurospora crassa* und Mesophyllzellen der Keimblätter als "Endomembransystem" eine bedeutsame Rolle spielt.

Im elektronenmikroskopischen Bild heben sich die Sphärosomen von *Neurospora crassa* wie die der Mesophyllzellen deutlich von allen anderen Zellorganellen ab; sie zeichnen sich durch ihre strukturlöse, offensichtlich nicht granuläre Matrix und die sie umgebende "halbe Elementarmembran" aus. Phytochemisch wurden sie bereits als Speicherstrukturen für Triglyceride bei höheren Pflanzen (Jacks et al., 1967; Tavener und Laidman, 1972; Appelquist, 1975) und vornehmlich Sterine bzw. Phospholipide bei Pilzzellen (Schaffner, 1974) identifiziert.

Zum ersten Mal wurden in dieser Arbeit bislang unbekannte membranöse Fortsätze an den Sphärosomen aller drei unter-

suchten Ölsamen entdeckt, die sowohl mit ihrer Entstehung als auch ihrem Abbau in Zusammenhang stehen könnten. Nach dieser in Abbildung 15 dargestellten Hypothese erfolgt der

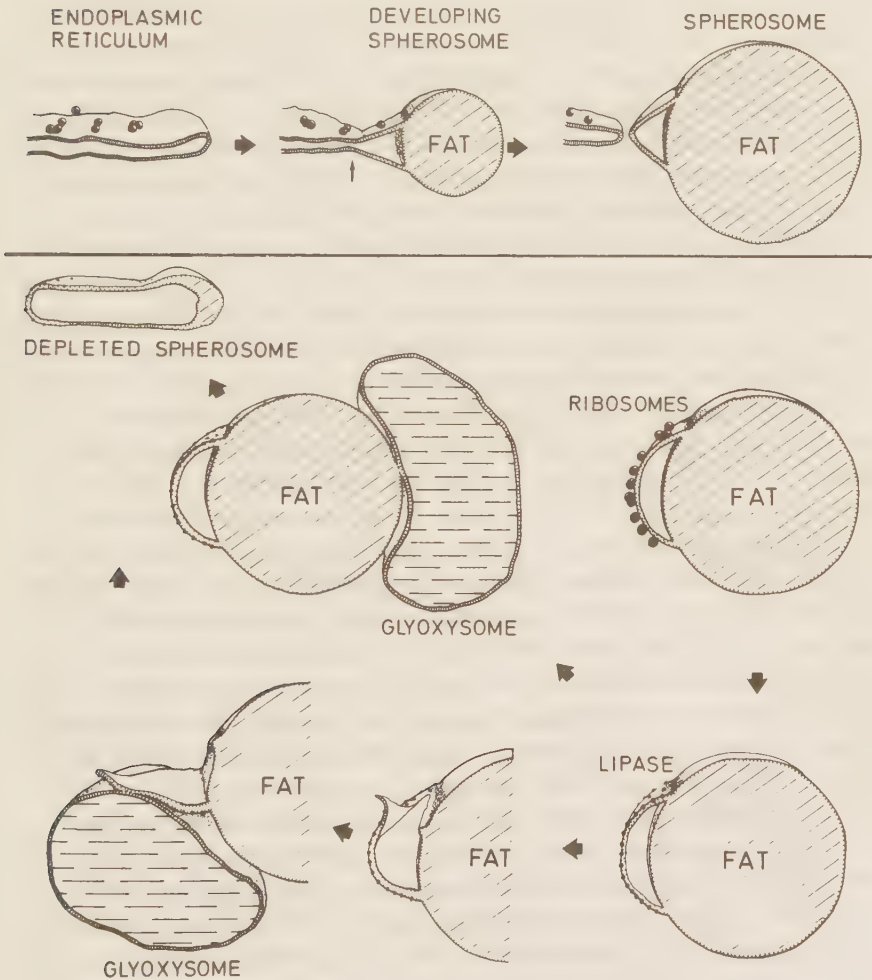


Abb.15:

Schematische Darstellung der Hypothese über die Entstehung und des Abbaues der Sphärosomen in den Kotyledonen von Ölsamen.

Einbau der lipophilen Speichersubstanzen in die Phospholipidhaltige Mittelschicht der Elementarmembran des ER, wobei die beiden Protein-Phospholipid-Lamellen auseinandergedrängt werden. Diese Vorstellung von der Entstehung der Sphärosomen stimmt im Prinzip mit dem Vorschlag anderer Autoren (Frey-Wyssling et al., 1963; Schwarzenbach, 1971; Yatsu und Jacks, 1972) überein. Allerdings sprechen die hier vorgelegten Daten dafür, daß eine Abtrennung von ER-Vesikeln nicht, wie bislang angenommen, vor der Triglycerideinlagerung erfolgt, sondern daß sich die Sphärosomen vom ER-Strang erst dann abschnüren, wenn sie ihre endgültige Größe erreicht haben. Dabei kann ein membranöser Fortsatz am Sphärosom zurückbleiben. Diese Annahme muß natürlich noch an reifenden Samen untersucht werden. Vorläufige Beobachtungen an sich entwickelnden Baumwollsamens unterstützen aber diese Annahme (Trelease, persönliche Mitteilung). Außerdem konnten bei der Bildung von Sphärosomen in *Neurospora crassa* Verbindungen mit dem ER beobachtet werden, wobei ebenfalls eine Dickenzunahme der Lipidhaltigen Mittelschicht der Elementarmembran des ER-Stranges zu erfolgen scheint (Bilder 51-54). Auch wurde das von Schwarzenbach (1971) beschriebene kleine Lumen im Inneren der Sphärosomen des Ricinus-Endosperms, das er als Rest des Lumens eines vor der Lipideinlagerung abgeschnürten ER-Vesikels interpretierte, in den hier untersuchten Objekten nie beobachtet. Diese Lumina könnten aber auch als quergeschnittene Invaginationen gedeutet werden; allerdings ist nicht auszuschließen, daß im Ricinus-Endosperm Sphärosomen nach einem anderen Mechanismus entstehen, zumal auch die intrazelluläre Lokalisierung der Lipase-Aktivität von der in fettspeichernden Mesophyllzellen abweicht (Muto und Beevers, 1974; Theimer und Rosnitschek, 1978). Eine Verbindung des entstehenden Sphärosoms mit dem ER, das bekanntlich als Ort der Synthese von Proteinen und Phospholipiden gilt (Lord et al., 1973),

könnte aber zwanglos die Herkunft der Membranbausteine erklären, die ja für die Vergrößerung der Oberfläche der halben Elementarmembran beim wachsenden Sphärosom benötigt werden.

Die mit signifikanter Häufigkeit anzutreffenden Membranfortsätze an den Sphärosomen bilden zusammen mit den physiologischen Daten (Rosnitschek, 1977) auch die Grundlage für ein neues Modell zu Mechanismus der Lipolyse in den Kotyledonen von Ölsamen. Der dichte Besatz dieser "Henkel" mit Ribosomen, der vor dem sichtbaren Beginn der Fettmobilisierung beobachtet wurde, ist ein deutlicher Hinweis auf eine Proteinsynthese. Da in den Kotyledonen in diesen Stadien die Aktivität einer membrangebundenen Lipase aufzutreten beginnt (Rosnitschek, 1977), könnten die "rauh" Appendices eine Neusynthese der Lipase bzw. eines Lipase-Aktivators in diesen Fortsätzen widerspiegeln. Die Fähigkeit, Ribosomen anzulagern, wurde bislang nur für ER-Membranen eindeutig nachgewiesen und ist somit ein weiterer Hinweis, daß diese Fortsätze aus dem ER entstanden sind. Diese Membranfortsätze würden demnach die aus Rohhomogenaten der Kotyledonen isolierten lipolytische Membran-Fraktion darstellen (Rosnitschek, 1977). Diese Annahme wird besonders dadurch gestützt, daß in dieser Fraktion Vesikel aus Elementarmembranen vorkommen, die aufgrund ihrer atypisch dicken lipidhaltigen Mittelschicht mit den Fortsätzen identisch sind (Wanner und Theimer, 1978). Die Hydrolyse der aus den Sphärosomen in die lipidhaltige Mittelschicht der Membranfortsätze nachströmenden Triglyceride scheint demgemäß in diesen Appendices stattzufinden. Die entstehenden bipolaren Fettsäuren können über die gesamte Oberfläche des Sphärosoms diffundieren, wobei sie ihre Bipolarität stets in fester Orientierung an der Sphärosomenoberfläche hält. Vorliegende Beobachtungen lassen sich zwanglos dadurch deuten, daß die

Glyoxysomen durch direkten Kontakt sowohl mit den Appendices (Bild 13) als auch mit der "halben Elementarmembran" der Sphärosomen (Bilder 11, 12, 13) die Fettsäuren aufnehmen. Dort werden sie aktiviert und in der β -Oxidation gespalten (Cooper und Beevers, 1969). Der fortschreitende Fettabbau wird in den beobachteten Zwischenformen schrumpfender Sphärosomen mit zahlreichen Invaginationen (Bilder 14, 15, 16) erkennbar, bis eine vollständige Entleerung den Prozeß beendet und ein Vesikel zurückbleibt, dessen Membran anfangs offenbar noch die atypisch dicke Mittelschicht aufweist (Bild 17).

Diese neue Hypothese vom Fettabbau in den Kotyledonen von Ölsamen ist eine klare Alternative zum einzigen bislang untersuchten zellphysiologischen Mechanismus der Lipolyse im Ricinus-Endosperm, wo die Lipase offensichtlich in der Membran der Sphärosomen selbst lokalisiert ist (Ory et al., 1968; Muto und Beevers, 1974).

Die Sphärosomen von *Neurospora crassa*, die im elektronenmikroskopischen Bild praktisch nicht von denen höherer Pflanzen zu unterscheiden sind, scheinen jedoch schon aufgrund ihres hohen Gehaltes an Phospholipiden und Sterinen (Schaffner, 1974) als Speicherkompartimente für Membranmaterial zu fungieren. Dies wird besonders durch einen Vergleich der Bilder 41 und 50 verdeutlicht. Mit dem Verschwinden des ER aus den Zellen nimmt die Zahl der Sphärosomen drastisch zu und in Zwischenstadien (Bilder 51-54) wurden häufig Verbindungen des ER mit Sphärosomen beobachtet. Ob dieser Vorgang auch rückläufig sein kann, muß erst durch weitere elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen geklärt werden. Der Mechanismus der Sphärosomenbildung durch Akkumulierung der Lipide in der Mittelschicht einer Elementarmembran ist aber sehr wahrscheinlich für beide eukaryontischen Zelltypen identisch.

Im Gegensatz dazu verläuft die Regulation der Microbodies von *Neurospora crassa* und Mesophyllzellen nach vollkommen unterschiedlichen Verfahren. Die bislang allgemein akzeptierte Regel, daß alle Microbodies als Grundausrüstung Katalase und H_2O_2 -produzierende Oxydasen besitzen (De Duve, 1969; Tolbert et al., 1970; Tolbert, 1971) und darüber hinaus zu Glyoxysomen oder Peroxisomen "differenziert" sein können, ist bei *Neurospora crassa* offensichtlich durchbrochen. Die cytochemischen Daten zeigen eindeutig, daß diese Zellen zwei verschiedene, morphologisch als Microbodies anzusprechende Organellen besitzen, von denen ein Typ Katalase-frei ist (Bild 42). Dieser Befund stimmt mit den biochemischen Resultaten überein, wonach durch Dichtegradientenzentrifugation Katalase-haltige Zellorganellen von Katalase-freien getrennt werden konnten, wobei letztere die Enzyme des Glyoxylsäurezyklus trugen (Theimer et al., 1978b). In Zellen höherer Pflanzen wurde bislang jedoch niemals die gleichzeitige Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Microbody-Populationen nachgewiesen. Beim Übergang der Keimblattzellen von "heterotrophen" Speicherzellen in photosynthetisch aktive Zellen ändert sich die Funktion der Microbody-Population, so daß auch in diesen Zellen zwei Microbody-Arten vorkommen, die aber zeitlich getrennt auftreten. Schon daraus kann man unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Microbodies in Zellen von *Neurospora crassa* und Keimblättern erwarten.

Die vorgelegten Daten zeigen in der Tat 2 unterschiedliche Mechanismen der Anpassung der Microbody-Population an veränderte Umweltbedingungen. Bei *Neurospora crassa* bedingt die Änderung des Substrates gleichzeitig mit der Erhöhung der glyoxysomalen Enzymaktivitäten (Theimer et al., 1978b) auch eine Zunahme der Zahl der sie tragenden Microbodies. In den Keimblättern werden durch Belichtung bzw. Kinetinbehandlung, welche in der Microbody-Population die Änderung

von glyoxysomaler in blattperoxisomaler Enzymausstattung induzieren, in den Übergangsphasen drastisch morphologische Veränderungen hervorgerufen.

Falls für Wassermelonenkeimlinge die "Zwei-Populations-Hypothese" (Kagawa et al., 1975) zutrifft, müßten in der Übergangsperiode von glyoxysomaler zu peroxisomaler Microbody-Funktion Abbaustadien von Glyoxysomen auftreten (Vigil, 1970) und zugleich eine de novo Bildung von Peroxisomen sich im Auftreten von Vorstadien zeigen (Gruber et al., 1973). Beides wurde in den vorliegenden Untersuchungen trotz Beobachtung tausender Zellen nicht entdeckt und ist auch in der Literatur nie beschrieben worden. Da am 7. Tag nach Keimungsbeginn die Aktivitäten der glyoxysomalen Leitenzyme bereits stark reduziert waren (Abb.5), können Veränderungen der Microbodies in erster Linie mit dem weiteren Ansteigen der peroxisomalen Enzymaktivitäten korreliert werden. Wenn man den Abbau ganzer Glyoxysomen voraussetzt, dann müßte er am 8. Tag bereits weitgehend erfolgt sein. Cytologische Veränderungen der Microbody-Population dürften demnach in einer Zunahme der Gesamtzahl, also der Zahl der neusynthetisierten Peroxisomen bestehen. Wenn man von einer de novo Synthese der Peroxisomen vom ER ausgeht (Kagawa et al., 1975), dann dürfte höchstens eine Größenzunahme der (neusynthetisierten) Microbodies zu beobachten sein und nicht, wie aus Abbildung 8-11 zu ersehen ist, eine Größenabnahme. Geht man aber von der Annahme aus, daß aus einem Glyoxysom jeweils ein Peroxisom entsteht, sollte die Gesamtzahl der Microbodies im Cytoplasma mehr oder weniger konstant bleiben, obwohl sie pro Zelle wegen der gleichzeitig fortschreitenden Vakuolisierung und Verringerung des Plasmainhaltes abnehmen kann. Die Auszählung der Microbody-Profile in den Palisadenparenchymzellen verschiedenen Alters zeigt deutlich, daß in

den Aufnahmen die Microbody-Profile mittlerer Größe zu Gunsten der kleineren Profile abnehmen. Dabei treten in den Übergangsstadien charakteristisch "längliche" Formen auf, was dadurch erklärt werden kann, daß sich die ursprünglich "mittleren" Glyoxysomen zu länglichen Übergangsformen strecken, einschnüren und nach der Durchtrennung als kleinere Peroxisomen vorliegen. Die größere Anzahl der Peroxisomen tritt nicht in Erscheinung, da die rege Längsteilung der Palisadenparenchymzellen im Stadium des Flächenwachstums der Kotyledonen die Zahl der Peroxisomen pro Zelle gleichzeitig reduziert. Dieser Vorgang wird durch Licht ausgelöst. Die im Dauerdunkel gehaltenen Kotyledonen zeigen keine signifikante Veränderung der Microbody-Population. Kinetin bewirkt die typische Gestaltveränderung der Microbodies im Licht und im Dunkeln; es kann Licht im Dunkeln ersetzen und wirkt bei gleichzeitiger Belichtung synergistisch und beschleunigt die Umwandlung. Dies stimmt exakt mit der Wirkung von Licht bzw. Kinetin auf die Änderung der Enzymaktivitäten der Microbody-Population überein und ist somit ein deutlicher Hinweis für eine Korrelation von Struktur- und Funktionswandel. Die Veränderungen der Größe der Microbody-Profile im Schwammparenchym sind vergleichbar mit denen im Palisadenparenchym. Hier werden allerdings aus den großen und mittleren Microbody-Profilen mittlere und kleinere, wobei längliche Übergangsformen relativ selten auftreten. Möglicherweise entstehen im Schwammparenchym die Peroxisomen durch einfache Teilung oder Knospung der Glyoxysomen.

Auch bei Sonnenblumenkeimlingen treten durch Bildung traubenartig verzweigter Microbodies und Invaginationen (Bilder 26-30) deutliche Veränderungen in der Microbodypopulation der Kotyledonen auf, wenn die Kulturbedingungen verändert werden. Die traubenförmigen Microbodies stellen möglicherweise eine Parallele zu den "länglichen" Microbody-

formen dar: Durch Oberflächenvergrößerung der Glyoxysomen, verbunden mit Ausstülpungen, Abschnürungen und mehrfachen Querteilungen, liegt im Übergangsstadium Glyoxysom/Peroxisom eine "Traube" vor, die sich dann in kleinere Peroxisomen auflöst. Da die Umgestaltung der Glyoxysomen in Peroxisomen über pleomorphe Intermediärformen mit einer Oberflächenvergrößerung der Microbodymembranen verbunden ist, muß zusätzliches Membranmaterial zur Verfügung gestellt werden. Die oft beschriebene Nachbarschaft zwischen Microbodies und ER (Frederick et al., 1968; 1975; Berger und Schnepf, 1970; Vigil, 1973) und die beobachteten Kontakte zwischen dem ER und den Microbodies (Bilder 33 und 35), sowie die Tatsache, daß das ER auch mit anderen Zellorganellen Verbindungen eingehen kann (ER/Mitochondrium siehe Bild 36 und ER/Chloroplast Bild 37) sprechen für die Annahme, daß das Membranmaterial vom ER stammt. Vor diesem Hintergrund kann wohl die Markierung der Microbody-Fraktion nach der Applikation von ^3H oder ^{14}C -Cholin in der Übergangsphase Glyoxysom/Blattperoxisom nicht weiter als Beweis für eine de novo Synthese ganzer Peroxisomen gedeutet werden (Kagawa et al., 1975). Daß darüberhinaus das ER möglicherweise auch für die Veränderung der Enzymausstattung durch Lieferung von neuen Proteinen verantwortlich ist, geht aus den Versuchen hervor, in denen mit Cycloheximid und höheren MgCl_2 Konzentrationen eine besondere Darstellung der Ribosomen und Polysomen gelang. Denn daraus ergeben sich keine Hinweise dafür, daß eine Proteinsynthese an den Microbodies selbst abläuft, wie sie z.B. für die äußere Mitochondrienmembran bei Hefen diskutiert wurde (Kellems und Butow, 1972).

Die Umgestaltung der Microbody-Population fettreicher Kotyledonen beim Übergang von Heterotrophie (Gluconeogenese) zu Autotrophie (Photosynthese) könnte dagegen zwanglos an einem Modell erklärt werden, dem die Anwendung des "Endo-

membranmodells" zugrunde liegt, das bereits für Ratten-leberzellen diskutiert (Morré et al., 1974) wurde. Demnach nimmt das ER eine zentrale Rolle bei der Umgestaltung der Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen ein. Die Microbodies liegen zu Beginn der Samenkeimung als Glyoxysomen im Verband mit dem ER vor (Abb. 16). Dieser zellinterne Verband dient dazu, nachfolgend peroxisomale Enzyme einzubauen und glyoxysomale Enzyme zu inaktivieren (Theimer, 1976) und/oder auszuschleusen. Wenn über das ER gleichzeitig noch Verbindungen zum "lytischen Kompartiment" der Zelle existieren (Matile, 1975), dann kann ein Wechsel der Enzymaktivitäten erfolgen, ohne daß das Kompartiment "Microbody" verlorengehen oder de novo entstehen muß. Die Struktur selbst ist dynamisch, so daß die beschriebenen Übergangsformen zwischen Glyoxysomen und Blattperoxisomen auftreten können, wie z.B. "längliche" Microbodies mit Einschnürungen (Bilder 18 A, 23, 24) oder Invaginationen (Bilder 12 und 30). Diese Hypothese ist die mit den feinstrukturellen Befunden am besten zu vereinbarende Alternative zu den drei bislang diskutierten Annahmen (Kagawa et al., 1975; Frederick et al., 1975; Schopfer et al., 1976).

Als bislang noch nie beschriebene Besonderheit lassen sich bei *Neurospora crassa* 2 Microbody-Typen nachweisen, die gleichzeitig anwesend sind, aber morphologische und biochemische Unterschiede zeigen und offenbar auch unabhängig reguliert werden (Theimer et al., 1978 b). Wachsen die Zellen auf einem Substrat, das über Acetyl-CoA in den Glyoxylsäurezyklus eingeschleust wird, tritt nur Microbody-Typ a (Glyoxysomen-Typ) bei unveränderter Größe und Form in deutlich größerer Anzahl auf (Tab.2). Der Katalase-haltige Microbody-Typ verändert sich im Gegensatz zum Typ a bei Erreichen der stationären Wachstumsphase der Zellkulturen recht auffällig in Größe und Form. Das dreidimensionale Modell (Bild 49) zeigt deutlich

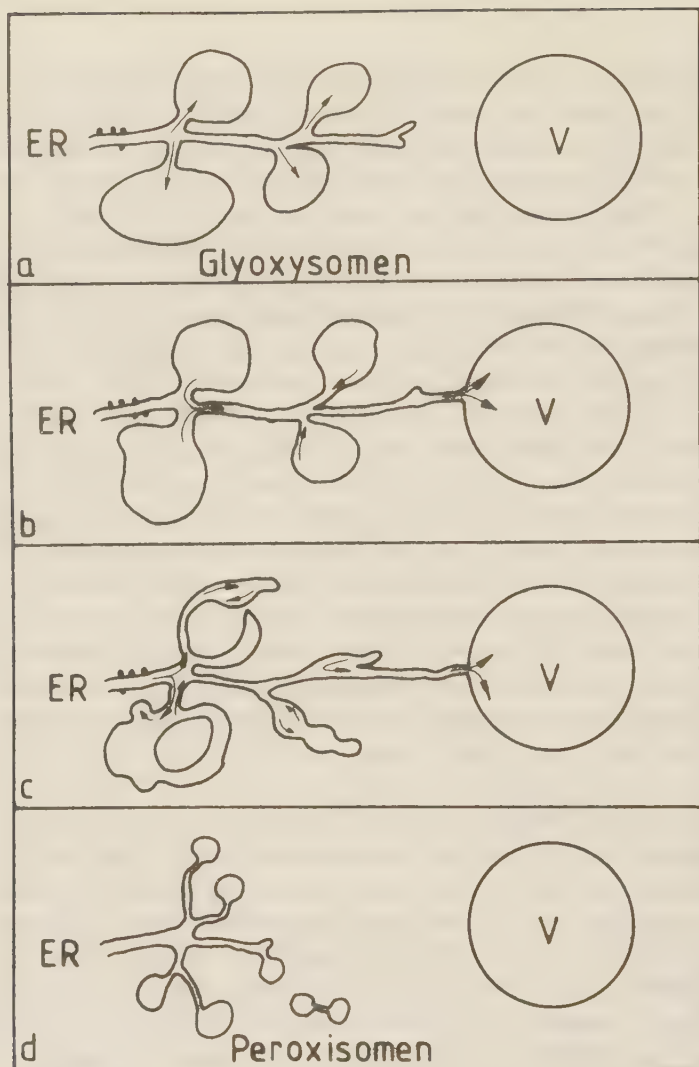


Abb.16:

Schematische Darstellung der Rolle des ER beim Übergang einer glyoxysomalen Microbody-Population in eine peroxisomale.

- Zunahme der glyoxysomalen Enzymaktivitäten (Keimungsbeginn)
- Abnahme der glyoxysomalen Enzymaktivitäten
- Zunahme der peroxisomalen Enzymaktivitäten
- Peroxisomale Microbody-Population.

die reiche Verzweigung dieses "Microbody-Systems". Besonders in älteren Zellstadien ist ein ausgeprägter Kontakt mit kleineren Vakuolen (Bilder 43, 46, 47) bzw. die Fusion mit ihnen zu beobachten (Bild 50). Solche Verbindungen der Microbodies mit Vakuolen könnten die Ursache für das Auftreten von Katalaseaktivität in den Vakuolen von *Saccharomyces cerevisiae* sein (Susani et al., 1976), da diese Hefezellen in der stationären Wachstumsphase aufgeschlossen wurden. Eine solche Vergrößerung des peroxisomalen Kompartimentes könnte bei einsetzender Seneszenz der Zellen induziert werden, wenn der Abbau von Purinen und Aminosäuren durch H_2O_2 -produzierende Oxydasen es erfordert (Theimer und Theimer, 1975).

Beide Microbody-Typen zeigen, wie in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen wurde, eindeutige Verbindungen mit dem ER, die besonders häufig in Zellen aus Kulturen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase auftreten (Bilder 66, 67 und 68). Dies deutet auf eine de novo Synthese durch terminale Abschnürung vom ER hin, wobei die Zahl der Microbodies pro Zelle während der intensiven Zellteilungen konstant gehalten oder bei Bedarf erhöht wird. Somit spielt das ER offensichtlich auch in der Entwicklung der Zellstrukturen von *Neurospora crassa* eine wichtige Rolle, da Verbindungen des ER mit allen Zellorganellen gezeigt werden konnten.

Solche enge Nachbarschaft des ER mit verschiedenen Zellorganellen wurden bei eukaryonten Zellen des Pflanzen- und Tierreiches bereits beschrieben (ER/Golgiapparat: Bracker et al., 1970; Flickinger 1969; Vigil, 1973; ER/Plastiden: Falk und Kleinig, 1968; ER/Mitochondrien: André, 1962; Kessel, 1971; Robertson, 1960/64; Ruby et al., 1969; Sandborn et al., 1964; Spriggs et al., 1967; ER/Lysosomen: Novikoff, 1967). Die bei *Neurospora crassa* "slime" beobachteten Verbindungen haben dagegen aber besonderes Gewicht,

weil alle am selben Objekt gleichzeitig nachzuweisen sind. Hier stellt sich das postulierte Endomembransystem (schematische Darstellung siehe Abb. 17) recht deutlich als integrierendes Kontinuum der von Cytomembranen abgegrenzten Zellkompartimente dar (s. auch Bild 71), das wahrscheinlich in Synthese, Akkumulation, Transformation und Translokation von Membranmaterial, Organellbestandteilen und Sekretionsprodukten einbezogen ist (Bracker und Grove, 1971).



Abb.17:

Schematische Darstellung eines "Endomembranmodelles" für eine *Neurospora crassa* "slime"-Zelle.

Allerdings kann dieses Endomembransystem die mögliche Bedeutung einer ganz anderen Art des Membrankontaktes nicht mindern. Es ist dies der sogenannte "close contact" (siehe Bild 33 und 35) verschiedener Membranen und bei allgemeiner Betrachtung auch die Kontakte zwischen Sphärosomen und Glyoxysomen (Bild 11 und 12). Grundlage eines derartigen Kontaktes könnte die Bildung einer Hybrid-Elementarmembran aus 2 Elementarmembranen verschiedener Zellorganelle über eine gemeinsame Lipidschicht sein (Schema siehe Abb.18).

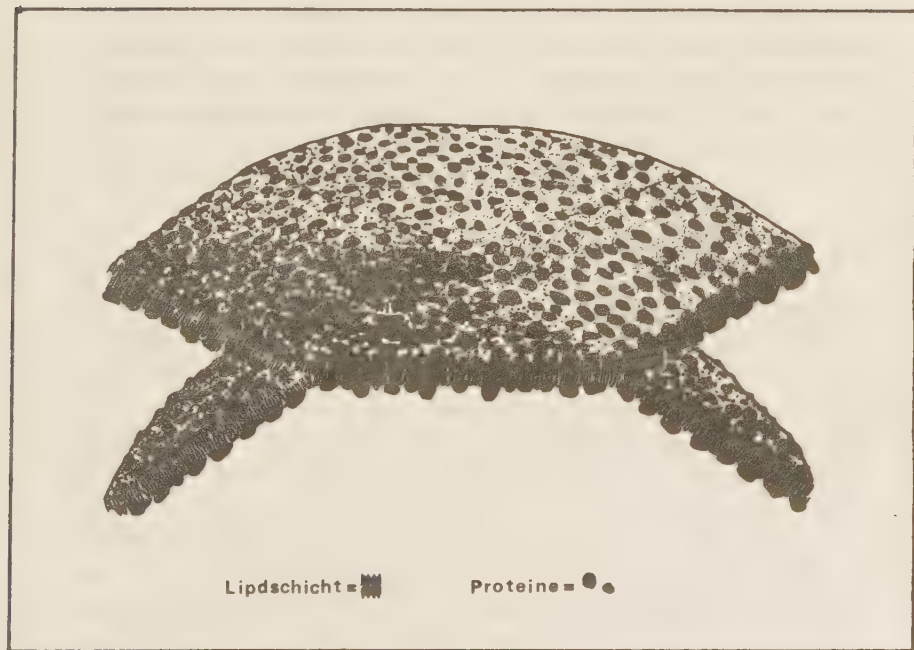


Abb.18:

Schematische Darstellung einer hypothetischen "Hybrid-Elementarmembran" aus zwei Elementarmembranen verschiedener Zellorganelle.

Der dabei entstehende Kontakt wird als "collisions complex" bezeichnet (Mc Murray und Dawson, 1969; Wirz und Zilversmit, 1969; Jungalwala und Dawson, 1970). Dadurch wäre ein Transport physiologischer Bausteine in einer Elementarmembran und der Aufnahme in ein anderes Zellorganell über diese "Hybridmembran" möglich, ohne daß die Integrität der Zellorganelle oder ein gleichzeitiger Transport z.B. in einem ER-Lumen beeinträchtigt würden. Aus dieser Sicht wäre es durchaus möglich, daß die wichtigen Veränderungen an den Microbody-Membranen im Übergang von glyoxysomaler zu peroxisomaler Funktion, wo viele membrangebundene Enzymaktivitäten wie z.B. die Malatsynthetase und die Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren verschwinden (Huang und Beevers, 1973; Bieglmayer und Ruis, 1974; Bieglmayer et al., 1974), durch solche ER-Kontakte mitgetragen werden.

E. Zusammenfassung

1. Die Sphärosomen in Mesophyllzellen fettspeichernder Kotyledonen von Sonnenblumen-, Raps- und Wassermelonenkeimlingen zeigen im elektronenmikroskopischen Bild eine Grenzmembran ("half unit membrane"), die in die beiden osmiophilen Schichten einer erstmals beschriebenen, atypischen Elementarmembran übergeht und somit einen Membranfortsatz des Sphärosoms bildet. Der lipophile Inhalt der Sphärosomen setzt sich in der dicken Mittelschicht dieses Appendix fort. Beim Abbau der Sphärosomen treten in diesen Invaginationen auf, die schließlich dazu führen, daß als Endstadium Vesikel aus Membranen mit atypisch dicker Mittelschicht zurückbleiben.

Diese ultrastrukturellen Befunde führten zusammen mit früher publizierten biochemischen Daten (Theimer und Rosnitschek, 1978) zu einer neuen Vorstellung über den zellphysiologischen Modus der Fettspeicherung und -mobilisierung: Danach entstehen die Sphärosomen durch Einlagerung von Triglyceriden in die Lipid-Mittelschicht der Elementarmembran des terminalen Endes eines ER-Stranges. Sie werden erst nach Erreichen ihrer endgültigen Größe abgeschnürt, wobei Teile des ER an den Sphärosomen zurückbleiben. Diese erstmals beschriebenen "Appendices" sind die Orte der Lipolyse, wobei die abgespaltenen freien Fettsäuren über die gesamte Sphärosomenoberfläche diffundieren und von angelagerten Microbodies aufgenommen werden können.

2. An Kotyledonen von Sonnenblumen- und Wassermelonenkeimlingen wurde gezeigt, daß die Microbodies nach Abbau der Fettreserven drastischen strukturellen Veränderungen unterworfen sind. Ursprünglich runde Microbody-Profile werden nach Belichtung oder Kinetinbehandlung der Keimlinge zu länglichen oder "traubenförmigen" Microbody-Formen oder zeigen Invaginationen. Diese Umwandlung ist genau mit der Änderung der Enzymaktivitäten von glyoxysomaler zu peroxisomaler Funktion korreliert. Anschließend treten in den Mesophyllgeweben der Kotyledonen fast ausschließlich kleine runde Microbody-Profile auf.

Diese biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen führten zu einer Alternative zu bisher diskutierten Modellen des Mechanismus der Umwandlung von einer glyoxysomalen Microbody-Population in eine peroxisomale: Danach spielt das endoplasmatische Retikulum eine tragende Rolle. Es stellt ständig Verbindungen mit den Microbodies her, was dazu dient, in Übergangsphasen peroxisomale Enzyme im Austausch gegen glyoxysomale Enzyme ein- bzw. auszuschleusen und/oder zu aktivieren bzw. zu inaktivieren. Dieser Microbody/ER-Verband ist dynamisch und die Grundlage für die beobachteten Strukturveränderungen der Microbodies.

Die an höheren Pflanzen gewonnenen Daten der ER-Verbindungen mit anderen Zellorganellen (Plastiden, Mitochondrien und Microbodies) sowie der Zellorganelle untereinander (Microbody/Chloroplast, Microbody/Sphärosom) werden als Hinweis gewertet, daß das "Endomembransystem" auch in Zellen höherer Pflanzen eine wichtige Rolle spielt bei Veränderungen von physiologischer Funktion und Zellstruktur.

3. Als bislang nie beschriebene Besonderheit lassen sich bei der *Neurospora crassa* "slime" Mutante 2 Microbody-Typen nachweisen, die gleichzeitig in den Zellen auftreten und unabhängig voneinander reguliert zu werden seinen: Ein Typ a ist Katalase-frei; unter Bedingungen

der Dereprimierung des Glyoxylsäurezyklus verdoppelt sich die Zahl der Profile dieses Typs in den Zellen. Typ b reagiert positiv im cytochemischen Nachweis auf Katalase; mit zunehmendem Alter der Zellen vergrößert sich das Gesamt-"Volumen" dieser Organelle in erster Linie durch "Wucherung" zu verzweigten Strukturen. Ein Teil eines solchen "Riesen"-Microbodies wurde aus Serienschnitten rekonstruiert. Dabei konnte auch mit Hilfe eines Projektionsmodelles das Vorkommen eines "mitochondrialen Retikulums" in Zellen von *Neurospora crassa* "slime" zumindest in der späten logarithmischen Wachstumsphase gezeigt werden. In Zellen der stationären Wachstumsphase wurde eine Fusion der Microbodies vom Typ b mit Vakuolen festgestellt.

4. Für *Neurospora crassa* "slime" wurde außerdem gezeigt, daß in Zellen von Pilzkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase das ER mit allen beobachteten Zellorganellen in Verbindung steht. Bei Zellkernen und Mitochondrien geht die äußere Membran der begrenzenden Doppelmembran direkt in das ER über, bei den Organellen mit einer einfachen Grenzmembran geht diese selbst in das ER über; es entsteht damit eine Verbindung der Matrix des Organells mit dem Lumen des ER. Damit wäre ein Austausch von Metaboliten oder Bausteinen möglich, die nicht durch die Membranen der Organelle aus dem Cytoplasma aufgenommen werden können.
5. Biochemisch und elektronenmikroskopisch wurde der Nachweis erbracht, daß das ER mit dem Alter der *Neurospora crassa* Zellen stark reduziert wird; an dessen Stelle treten Sphärosomen, die offensichtlich ebenfalls am ER gebildet werden und möglicherweise als Speicher für Membranbausteine dienen.

F. Literaturverzeichnis

- André, J. (1962). Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. J.Ultrastruct.Res.Suppl.3, 1-185.
- Appelquist, L.A. (1975). Biochemical and structural aspects of storage and membrane lipids in developing oil seeds. Recent advances of the chemistry and biochemistry of plant lipids. Academic Press New York.
- Allen, E. (1976). Development of cristalline inclusions (erosterol crystals) in *Neurospora crassa*. Protoplasma 90, 297-306.
- Arnold, C.G., O.Schimmer, F.Schötz und H.Bathelt (1972). Die Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch. Microbiol. 81, 50-67.
- Beevers, H. (1969). Glyoxysomes of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. Annals of N.Y.Academy of Sciences 168, Art.2, 313-324.
- Beevers, H., R.R.Theimer und J.Feierabend (1974). Microbodies, Glyoxysomen, Peroxisomen, in: Biochem.Zytologie der Pflanzenzelle. Hrsg.G.Jacobi, Thieme Verlag Stuttgart.
- Berger, C. und E.Schnepf (1970). Entwicklung und Altern der Spadix-Appendices von *Sauromatum guttatum* Schott und *Arum maculatum* L. Protoplasma 69, 237-251.

- Bieglmayer, C. und H.Ruis (1974). Protein composition of the glyoxysomal membrane. FEBS letters 47, 1, 53-55.
- Bieglmayer, C., H.Ruis und J.Graf (1974). Cytochemical localization of catalase activity in glyoxysomes from castor bean endosperm. Plant Physiol. 53, 276-278.
- Bonner, J. (1960). Symp. Protein Synthesis, Wassenaar Acad. Press London. Zitiert in: Frey-Wyssling und Mühlethaler, Ultrastructural Plant Cytology; Elsevier Publ. Comp. 1965.
- Breidenbach, R.W. und H.Beevers (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. Biochem.Biophys.Res.Comm.27, 462-469.
- Bracker, C.E., C.E.Heintz und S.N.Grove (1970). Structural and functional continuity among endomembrane organelles in fungi. Microscopie Electronique, 103-104.
- Bracker, C.E. und S.N.Grove (1971). Surface structure on outer mitochondrial membranes of Pythium ultimum. Cyto-biologie 3, 229-239.
- Cooper, T.G. und H.Beevers (1969). β -oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. J.biol.Chem. 244, 3514-3520.
- Davison, M.T. und P.B.Garland (1977). Structure of mitochondria and vacuoles of Candida utilis and Schizosaccharomyces pombe studied by electron microscopy. J.Gen.Microbiol. 98, 147-155.
- De Duve, C. (1960). Intracellular localization of enzymes. Nature (London) 187, 836.
- De Duve, C. (1969). ed.: Peroxisomes (Microbodies, Glyoxysomes). N.Y.Acad.Sci.168.
- Dixon, G.H. und H.S.Kornberg (1959). Assay methods for the enzymes of the glyoxylate cycle. J.Biochem.72, 3.

- Drumm, H. und P. Schopfer (1974). Effect of phytochrome in development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 120, 13-30.
- Duntze, W., D. Neumann, J.M. Gancedo, W. Atzpodien und H. Holzer (1969). Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 10, 83-89.
- Emerson, S. (1963). Slime, a plasmodioid variant of *Neurospora crassa*. *Genetica* 34, 162-182.
- Fahimi, D.H. (1969). Cytochemical localization of peroxidatic activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J. Cell. Biol.* 43, 275-279.
- Falk, H. und H. Kleinig (1968). Feinbau und Carotinoide von *Trigonema* (Xanthophyceae). *Arch. Mikrobiol.* 61, 347-362.
- Flavell, R.B. und D.O. Woodward (1970). The concurrent regulation of metabolically related enzymes. The Krebs cycle and glyoxylate shunt enzymes in *Neurospora*. *Eur. J. Biochem.* 17, 284-291.
- Flavell, R.B. und D.O. Woodward (1971). Metabolic role, regulation of synthesis, cellular localization and genetic control of the glyoxylate cycle enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bact.* 105, 200-210.
- Flickinger, C.J. (1969). The development of Golgi complexes and their dependence upon the nucleus in *Amebae*. *J. Cell Biol.* 43, 250-262.
- Frederick, S.E., E.H. Newcomb, E.L. Vigil und W.P. Wergin (1968). Fine structure characterizations of plant microbodies. *Planta (Berl.)* 81, 229-252.

- Frederick, S.E., P.J.Gruber und E.H.Newcomb (1975). Plant microbodies (Review article). Protoplasma 84, 1-29.
- Frey-Wyssling, A. und K.Mühlethaler (1965). Ultrastructural plant cytology. Elsevier Publ. Comp. (Amsterdam, New York, London)
- George, P. (1953). Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents. J.Biol.Chem. 201, 413-425.
- Gerhardt, B. und H. Beevers (1970). Developmental studies in glyoxysomes in Ricinus endosperm. J.Cell Biol. 44, 94-102.
- Gerhardt, B. (1973). Untersuchungen zur Funktionsänderung der Microbodies in den Keimblättern von Helianthus annuus L. Planta 110, 15-28.
- Gerhardt, B. (1974a). The change in microbody function in developing sunflower cotyledons, study in the regulatory mechanism. Port.Acta Biol.Ser.A. XIV Intern.Symp.Plant Cell Differentiation 3-19.
- Gerhardt, B. (1974b). Zur Funktion der Microbodies. Biol.i.u. Zeit/ 4. Jahrgang 1974, Nr.6.
- Gerhardt, B. und T. Betsche (1976). The change of microbodies from glyoxysomal to peroxisomal function within fatty, greening cotyledons: hypotheses, results, problems. Ber.Deutsch.Bot.Ges. 89, 321-334.
- Gregory, R.P.F. (1966). A rapid assay for peroxidase activity. Biochem.J. 101, 582-584.
- Gruber, P.J., R.N.Trelease, W.M.Becker und E.H.Newcomb (1970). A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fat-storing seeds. Planta (Berl.) 92, 269-288.

- Gruber, P.J., W.M.Becker und E.H.Newcomb (1973). The development of microbodies and peroxisomal enzymes in greening bean leaves. *J.Cell Biol.* 56, 500-518.
- Hoch, H.C. und D.P.Maxwell (1974). Proteinaceous hexagonal inclusions in hyphae of *Whetzelnia sclerotiorum* and *Neurospora crassa*. *Canad.J.Microbiol.* 20, 1029-1035.
- Hock, B. und H.Beevers (1966). Development and decline of the glyoxylate-cycle enzymes in watermelon seedlings. *Z.Pflanzenphysiol.* 55, 405-414.
- Hrsel, J. (1966). The morphology and function of vesicles and of vesicles related formations in cell ultrastructure. *Biol. Plant (Praha)* 8: 263-272, zitiert in: L.Y.Yatsu und T.J. Jacks (1972), Spherosome Membranes. *Plant Physiol.* 49, 937.
- Huang, A.H.C. und H.Beevers (1973). Localization of enzymes within microbodies. *J.Cell Biol.* 58, 379-389.
- Jensen, T.E. und J.G.Valdovinos (1967). Fine structure of abscissin zones. *Planta (Berl.)* 77, 289-318.
- Jacks, T.J. und L.Y.Yatsu (1974). Phosphate inhibition of lipase activity in peanuts. *J.Amer.Oil Chem.Soc.* 51, 112.
- Jacks, T.J., L.Y.Yatsu und A.M.Altschul (1967). Isolation and characterization of peanut spherosomes. *Plant Physiol.* 42, 585-597.
- Jungalwala, F.B. und R.M.Dawson (1970). Phospholipid synthesis and exchange in isolated liver cells. *J.Biochem.* 117, 481-490.
- Kagawa, T., Mc Gregor D.I. und H.Beevers (1973). Development of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings. *Plant Physiol.* 51, 66-72.

- Kagawa, T. und H.Beevers (1975). The development of microbodies (glyoxysomes and leaf peroxisomes) in cotyledons of germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol.* 55, 258-264.
- Kagawa, T., J.M.Lord und H.Beevers (1975). Lecithin synthesis during microbody biogenesis in watermelon cotyledons. *Arch.Biochem.Biophys.* 167, 45-53.
- Kellems, R.E. und R.A.Butow (1972). Cytoplasmic 80S ribosomes associated with yeast mitochondria, I.Evidence for ribosomes binding sites on yeast mitochondria. *J.Biol. Chem.* 247, 8043-8050.
- Kellenberger, E., W.Schwab und J.Sechaud (1958). *Experientia* 12, 421, zitiert in: D.Kay: *Techniques for elektron microscopy*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1961.
- Kessel, R.G. (1971). Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocyte. II. Intramitochondrial yolk, *Z.Zellforsch.* 112, 313-332, zitiert in Bracker und Grove 1971.
- Kobr, M.J., F.Vanderhaeghe und G.Combeppine (1969). Particulate enzymes of the glyoxylate cycle in *Neurospora crassa*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 37, 640-645.
- Lord, J.M., T.Kagawa, T.S.Moore und H.Beevers (1973). Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J.Cell Biol.* 57, 659-667.
- Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Randall (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193, 265.
- Lück, H. (1965). Catalase. "Methods of Enzyme Analysis" (ed.H.U. Bergmeyer), Academic Press New York, p.885.

- Margoliash, E, und A.Novogrodsky (1958). Biochem.J.68, 468.
zitiert in: Vigil, E.L. (1973). Structure and function of
plant microbodies. Sub-Cell.Biochem. 2, 237-285.
- Matile, P. (1975). The lytic compartment of plant cells.
Springer Verlag Wien, New York.
- Maxwell, D.P., P.H.Williams und M.D.Maxwell (1970). Microbodies
and lipid bodies in the hyphal tips of *Sclerotinia*
sclerotiorum. Canad.J.Bot. 48, 1689-1691.
- Maxwell, D.P., M.D.Maxwell, G.Haussler, V.N.Armentrout, G.M.
Murray und H.C.Hoch (1975). Microbodies an glyoxylate-cycle
enzyme activities in filamentous fungi. Planta
124, 109-123.
- Mc Murray, W.C. und R.M.Dawson (1969). Phospholipid exchange
reactions within the liver cell. J.Biochem. 112, 91-108.
- Morré, D., W.N.Yunghans, E.L.Vigil und T.W.Kennan (1974).
Isolation of organelles and endomembrane components from
rat liver: biochemical markers and quantitative
morphometry. in: Methodological developments in
biochemistry, Vol. 4. E.Reid, editor.
- Muto, S. und H. Beevers (1974). Lipase activities in castor
bean endosperm during germination. Plant Physiol. 54,
23-28.
- Newcomb, E.H. und W.M.Becker (1974). The diversity of plant
organelles with spezial reference to the electron
cytochemical localization of catalase in plant micro-
bodies. Methods in Enzymology 31 A. Hrsg.S.Fleischer u.
L.Packer.

- Novikoff, A.B. (1967). Lysosomes in nerve cells. The Neuron (H.Heyden, ed.), p.319-377. Amsterdam: Elsevier. Zitiert in Bracker und Grove 1971.
- Ory, R., L.Y.Yatsu und H.W.Kirchner (1968). Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. Arch.Biochem.Biophys. 123, 255.
- Osumi, M., N.Miwa, Y.Teranishi, A.Tanaka und S.Fukui (1974). Ultrastructure of *Candida* yeasts grown on n-alkanes. Appearance of microbodies and its relationship to high catalase activity. Arch.Microbiol. 99, 181-201.
- Robertson, J.D. (1964). Unit membranes: A review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes. Cellular Membranes in Development (M.Locke, ed.) p.1-81, New York, Academic Press. Zitiert in Bracker u.Grove 1971.
- Robertson, J.D. (1960). Interrelationships between mitochondria and the endoplasmic reticulum bearing on a theory of the origin of mitochondria. J.Physiol. 153, 58-59. Zitiert in Bracker u. Grove 1971.
- Roggkamp, R., H.Sahm, W.Hinkelmann und F.Wagner (1975). Alcohol oxidase and catalase in peroxisomes of methanol grown *Candida boidinii*. Eur.J.Biochem.59, 231-236.
- Rosnitschek, I. (1977). Untersuchungen über Regulation, intrazelluläre Lokalisierung und Eigenschaften der Lipase in den Kotyledonen von Rapskeimlingen (*Brassica napus*). Dissertation, Botanisches Institut München.
- Ruby, J.R., R.F.Dyer und R.G.Skalko (1969). Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. Z.Zellforsch.97, 30-37. Zitiert in Bracker u.Grove 1971.

- Sahm, H., R.Roggenkamp, F.Wagner und W.Hinkelmann (1975).
Microbodies in methanol-grown *Candida boidinii*. J.Gen.
Microbiol. 88, 218-222.
- Sandborn, E., P.F.Koen, J.D.Mc Nabb und G.Moore (1964).
Cytoplasmic microtubules in mammalian cells. J.Ultrastr.Res.
11, 123-138.
- Schaffner, N. (1974). Funktion der Lipasen und Lipidgranula in
der Bäckerhefe. Thesis No. 5287 ETH Zürich.
- Schnarrenberger, C., A.Oeser und N.E.Tolbert (1971). Development
of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean
endosperm during germination. Plant Physiol. 48, 566-574.
- Schopfer, P., D.Bajracharya, R.Bergfeld und H.Falk (1976).
Glyoxysomen in Kotyledonen von *Sinapis alba*. Symposium
DBG, Zürich 1976.
- Schulz, H. (1958). Die submikroskopische Pathologie der Cyto-
somen in den Alveolarmakrophagen der Lunge. Beitr.Path.
Anat. und Allg.Path. 119, 71-91.
- Schulz, H.U. und H.Staudinger (1975). Struktur und Funktion des
endoplasmatischen Retikulums. Naturwissenschaften 62,
331-340.
- Schwarzenbach, A.M. (1971). Observations on spherosomal membranes.
Cytobiologie 4, 145.
- Spriggs, T.L.B., J.D.Lever und J.D.P.Graham (1967). Membrane
connections at adrenergic terminals. J.Microscopie 6,
425-430.
- Spurr, A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium
for electron microscopy. J.Ultrastr.Res. 26, 31-43.

- Susani, M., P.Zimniak, F.Fessel und H.Ruis (1976). Localization of catalase A in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for the vacuolar nature of isolated "Yeast Peroxisomes". Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 961-970.
- Taska, R.J. und N.Hillmann (1970). Effects of actinomycin D and cycloheximid on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryos. Nature 225, 1022-1025.
- Theimer, R.R. (1973). Use of a spheroplast-like *Neurospora crassa* slime mutant for investigation of subcellular structures. Garcia-Acha (ed.): Yeast, Mold and Plant Protoplasts, Acad.Press, New York, 247-255.
- Theimer, R.R. und E.Theimer (1975). Studies on the development and localization of catalase and H_2O_2 -generating oxidases in the endosperm of germinating castor beans. Plant Physiol. 56, 100-104.
- Theimer, R.R., G.Anding und B.Schmid-Neuhaus (1975). Density labeling evidence against a de novo formation of peroxisomes during greening of fat-storing cotyledons. FEBS letters 57, 89-92.
- Theimer, R.R. (1976). A specific inactivator of glyoxysomal isocitrate lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons. FEBS letters 62, 297-300.
- Theimer, R.R., Anding G. und P.Matzner (1976). Kinetin action on the development of microbody enzymes in sunflower cotyledons in the dark. Planta (Berl.) 128, 41-47.
- Theimer, R.R. und I.Rosnitschek (1978). Development and intracellular localization of lipase activity in rape seed (*Brassica napus* L.) cotyledons. Planta (1977) angenommen zur Publikation.

- Theimer, R.R., P.Matzner und G.Anding (1978a). Interactions of light and kinetin in the change of microbody function in cotyledons of *Helianthus annuus* L. *Planta* (1977) angenommen zur Publikation.
- Theimer, R.R., G.Wanner und G.Anding (1978b). Regulation and biochemical properties of two types of microbody in *Neurospora crassa* cells. *Cytobiol.* (1977) eingereicht zur Publikation.
- Tavener, R.J.A. und D.L.Laidman (1972). The induction of triglyceride metabolism in the germinating wheat grain. *Phytochemistry* 11, 981.
- Todd, M.M. und E.L.Vigil (1972). Cytochemical localization of peroxidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Histochem.Cytochem.* 20, 344-349.
- Tolbert, N.E., A.Oeser, T.Kisaki, R.H.Hagemann und R.K.Yamazaki (1968). Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J.Biol.Chem.* 243, 5179-5184.
- Tolbert, N.E., Yamazaki, R.K. und A.Oeser (1970). Localization and properties of hydroxypyruvate reductases in spinach leaf particles. *J.Biol.Chem.* 245, 5129-5136.
- Tolbert, N.E. (1971). Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 22, 45-74.
- Trelease, N.E., W.M.Becker, P.J.Gruber und E.N.Newcomb (1971). Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light- and dark-grown seedlings. *Plant Physiol.* 48, 461-475.

- Tsuda, S. und E.L.Tatum (1961). Intracellular crystalline ergosterol in *Neurospora*. *J.biophys.biochem.Cytol.*11, 171-177.
- Van Dijken, M., M.Veenhuis, C.A.Vermeulen und W.Harder (1975). Cytochemical localization of catalase activity in methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch.Microbiol.* 105, 261-267.
- Van Winkle, W.B. (1969). Preliminary observations of the ultra-structure of the slime mutant. *Neurospora Newsletters*,5.
- Vasquez, D. (1974). Inhibitors of protein synthesis. *FEBS letters* 40, 63-84.
- Vigil, E.L. (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J.Cell Biol.* 45, 435-454.
- Vigil, E.L. (1973). Structure and function of plant microbodies. *Sub-Cell.Biochem.*2, 237-285.
- Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol.Genet.Bull.* 13, 42.
- Wanner, G. (1974). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Einfluß des Substrates auf die Feinstruktur zweier *Neurospora crassa* "slime" Mutanten. Diplomarbeit, Botanisches Institut München.
- Wanner, G. und R.R.Theimer (1977). Membranous appendices of spherosomes (oleosomes). Possible role in fat utilization in germinating oil seeds. *Planta* (1977), eingereicht zur Publikation.
- Wergin, W.P. (1973). Development of woronin bodies from microbodies in *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici. *Protoplasma* 76, 249-260.

Wirtz, K.W.A. und D.B.Zilversmit (1970). Partial purification of phospholipid exchange protein from beef heart. Fed.Europ.Biochem.Soc.Letters 7, 44-46.

Woodward, V.W. und C.K.Woodward (1968). The care and feeding of slime. Neurospora Newsletter 13, 18.

Yatsu, L.Y. und T.J.Jacks (1972). Spherosome membranes. Half unit membranes. Plant Physiol. 49, 937.

G. Bildteil

Vergrößerungen der Bilder

Soweit nicht anders angegeben, entspricht der in den Aufnahmen eingetragene Maßstrich jeweils 0.1 μm .

Abkürzungen:

CHX	=	Cycloheximid
CM	=	Cytoplasmamembran
CP	=	Cytoplasma
CW	=	Zellwand
DAB	=	Diaminobenzidinhydrochlorid
ER	=	endoplasmatisches Retikulum
Ki	=	Kinetin
M	=	Mitochondrium
Mb	=	Microbody
Mb a	=	Microbody-Typ a
Mb b	=	Microbody-Typ b
N	=	Zellkern
PL	=	Plasmalemma
PP	=	Palisadenparenchym
Rb	=	Ribosomen
SP	=	Schwammparenchym
Sph	=	Sphärosom
TP	=	Tonoplast
V	=	Vakuole

Tafel I

Bild 1:

Vergleich der im elektronenmikroskopischen Präparat sichtbaren Struktur einer "half unit membrane" (hum) eines Sphärosoms mit der "unit membrane" des Tonoplasten (TP) und des Plasmalemmas (PL). Mesophyllzelle des Kotyledons eines 7 Tage alten, etiolierten Wassermelonenskeimlings.

Bild 2:

Sphärosom in einer Mesophyllzelle eines Kotyledons im ruhenden Samen von Sonnenblumen. Eine "half unit membrane"-ähnliche Struktur steht in enger Verbindung mit dem Sphärosom (s.Pfeile).

Bild 3+4:

Sphärosomen in Mesophyllzellen von Kotyledonen 4 Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge. Die Mittelschicht des membranähnlichen Appendix steht in direkter Verbindung mit dem Inhalt des Sphärosoms (s.Pfeile). Der Appendix kann henkelförmig (3) oder schwanzförmig (4) sein.

Bild 5:

Sphärosom aus einer Mesophyllzelle eines 4 Tage alten Sonnenblumenkotyledons (3 Tage Dunkel + 1 Tag Licht) mit Appendix.

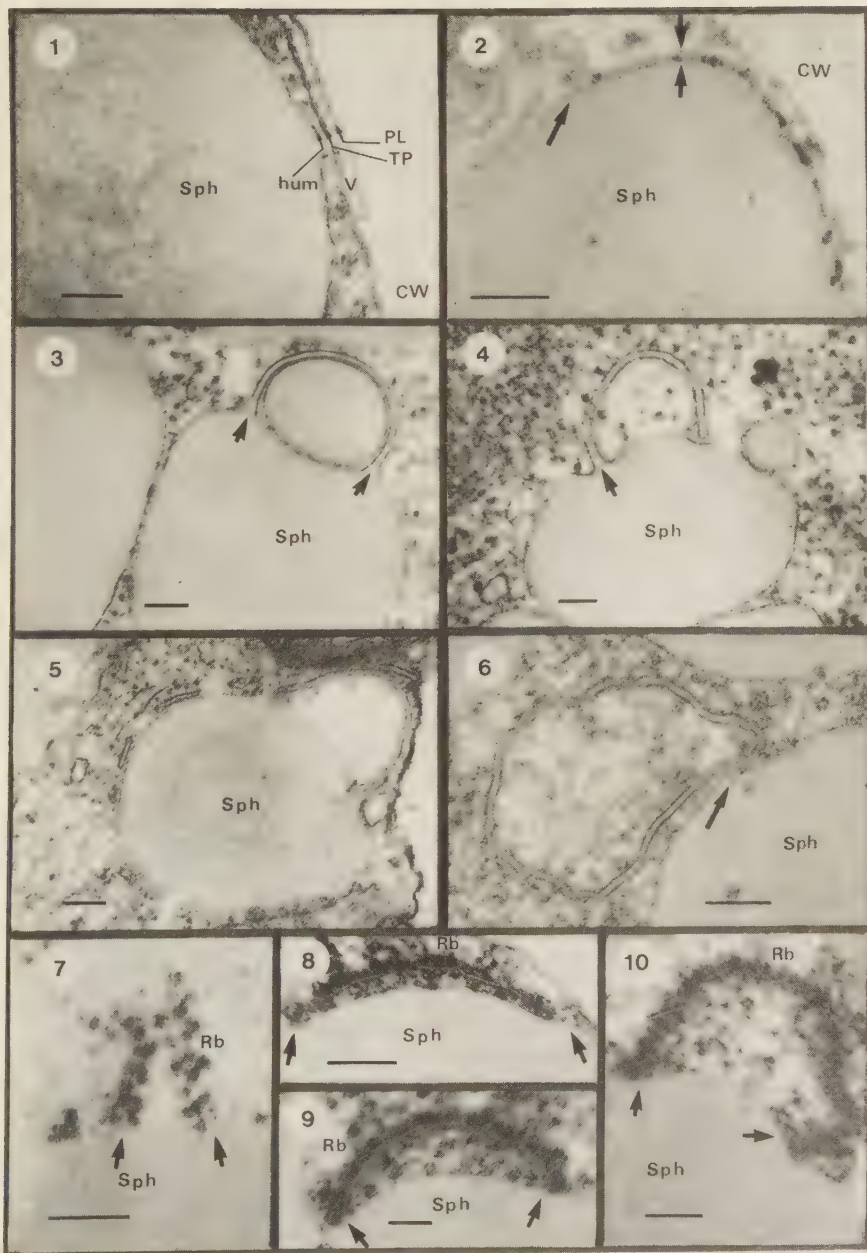
Bild 6:

Sphärosom aus einer Mesophyllzelle des Kotyledons eines 7 Tage alten, etiolierten Wassermelonenskeimlings. Die Mittelschicht des membranähnlichen Appendix steht mit der Matrix des Sphärosoms in direkter Verbindung.

Bilder 7-10:

Dichter, Cytoplasma-seitiger Besatz der Appendices von Sphärosomen mit Ribosomen (Bild 7: 4 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimling; Bilder 8-10: 7 Tage alte, etiolierte Wassermelonenskeimlinge). Die Appendices sind in allen Fällen henkelförmig (s.Pfeile).

Tafel I



Tafel II

Bilder 11+12:

Membrankontakte zwischen Sphärosomen und Microbodies (s.Pfeile) in den Mesophyllzellen der Kotyledonen von Rapskeimlingen (Bild 11: Raps 4 Tage etioliert) und Sonnenblumenkeimlingen (Bild 12: 5 Tage etioliert und 2 Tage belichtet).

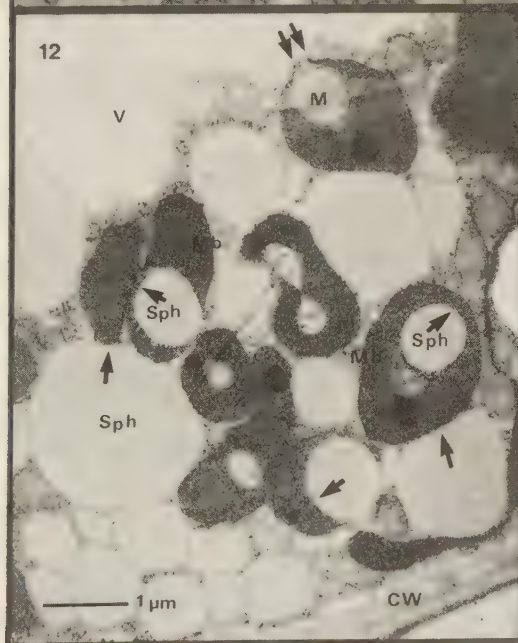
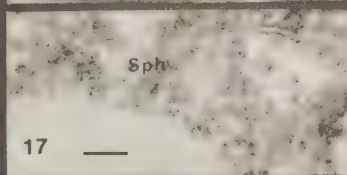
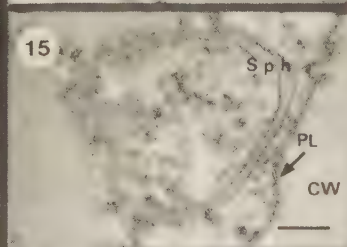
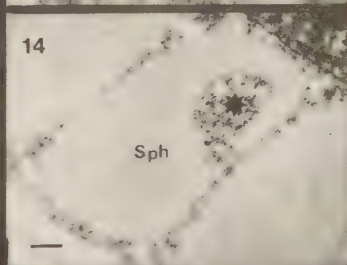
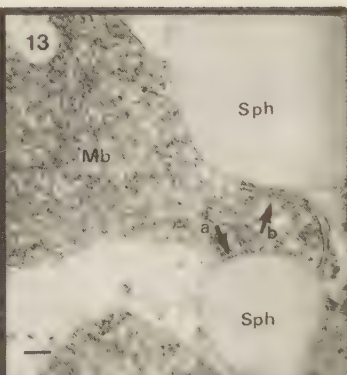
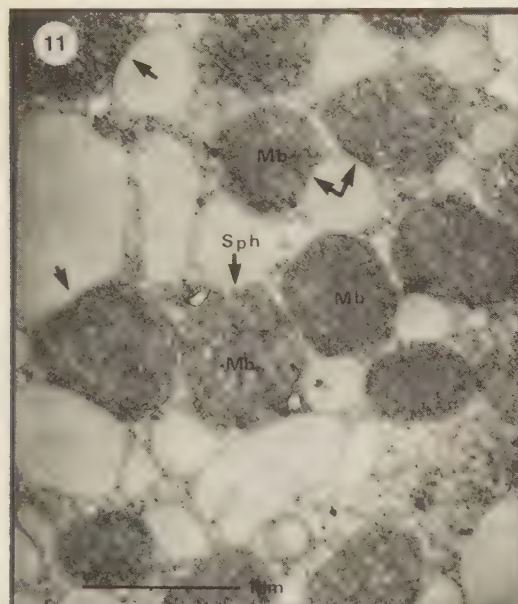
Bild 13:

Membrankontakt zwischen Microbody und Sphärosom mit der Oberfläche (Pfeil a) und dem schwanzförmigen Appendix (Pfeil b) eines Sphärosoms. Präparat eines Kotyledons eines 4 Tage alten etiolierten Rapskeimlings.

Bilder 14-17:

Verschiedene Stadien des Sphärosomen-Abbaues in Mesophyllzellen 7 Tage alter etiolierter Wassermelonenkotyledonen. Invaginationen treten bereits an größeren Sphärosomen auf (14, Stern) und erweitern sich mit fortschreitendem Fettabbau (15). Stark geschrumpfte Sphärosomen mit mehreren Invaginationen (16, Sterne) leiten schließlich zum "Endstadium" der Entleerung über: Membranvesikel mit cytoplasmatischem Inhalt und Membranen (Bild 17), die frei im Cytoplasma vorliegen unterscheiden sich im elektronenmikroskopischen Bild durch die auffallend dickere Mittelschicht von Elementarmembranen (s.Pfeil PL in Bild 15).

Tafel II



Tafel III

Bilder 18 A mit 20 B:

Verschiedene Stadien der Veränderung der Microbody-Population im Schwamm- und Palisadenparenchym der Wassermelonenkeimlinge. A = Palisadenparenchym, B = Schwammparenchym des gleichen Schnittes (!).

Bild 18 A:

Microbody-Profile in Präparaten 7 Tage alter etiolierter Wassermelonenkeimlinge (kleine und mittlere, s.Text S.36) im Palisadenparenchym

Bild 18 B:

und vorwiegend große und mittlere Microbodies im Schwammparenchym.

Bild 19 A:

Nach einem Tag Belichtung und Kinetinbehandlung treten im Palisadenparenchym längliche Microbody-Profile auf (Pfeile).

Bild 19 B:

Abnahme der Zahl der großen Microbodies im Schwammparenchym.

Bild 20 A:

Microbody-Profile nach 2 Tagen Belichtung: nur kleine Microbodies und einzelne längliche (s.Pfeil).

Bild 20 B:

Im Schwammparenchym gelegentlich größere Microbodies mit Tendenz zur "Traubenbildung" (s.Pfeile).

Bild 21:

Kontrolle: Gleiches Gewebe wie in 18 B, jedoch DAB-Gemisch mit 5 mM Aminotriazol (Katalasehemmer). Die Microbodies sind nicht sichtbar, da die enzymatische (Katalase-)Reaktion gehemmt ist.

Bild 22 A+B:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben 18 A und 18 B: Die Microbodies im Palisadenparenchym sind deutlich kleiner als im Schwammparenchym.

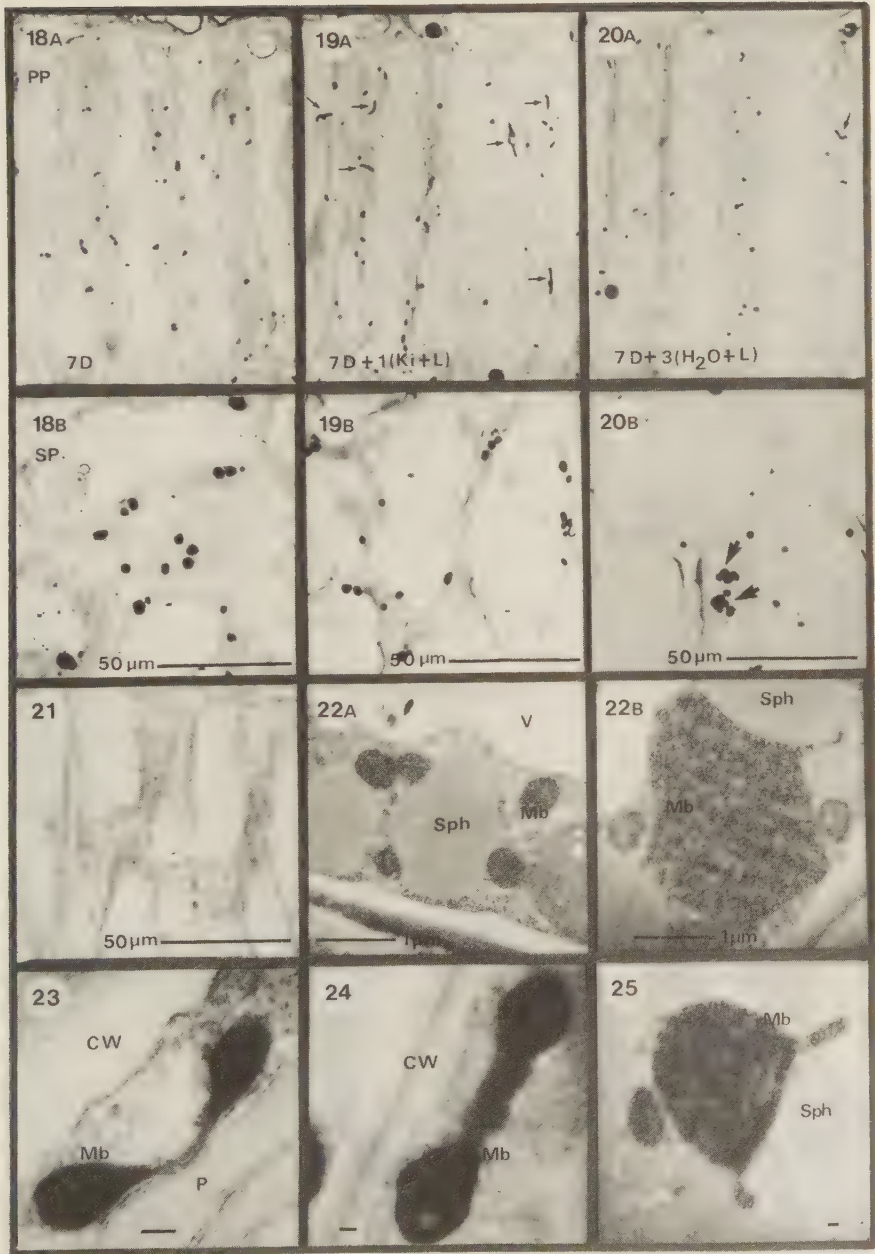
Bilder 23+24:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen länglicher Microbody-Profile im Palisadenparenchym des Kotyledos eines Wassermelonenkeimlings (7 Tage etioliert + 3 Tage belichtet mit Kinetinbehandlung).

Bild 25:

Microbody aus dem Schwammparenchym des Kotyledos eines Wassermelonenkeimlings (7 Tage etioliert + 3 Tage im Dunkeln mit Kinetinbehandlung).

Tafel III



Tafel IV

Bilder 26-29:

Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veränderung der Microbody-Population in Mesophyllzellen von Sonnenblumenkotyledonen.

Bild 26:

Mesophyllzellen des Kotyledos eines 5 Tage alten etiolierten Sonnenblumenkotyledos; die Veränderung der Microbody-Profile dieser Keimlinge nach 2-tägiger Behandlung mit Licht und/oder Kinetin wurde untersucht.

Bild 27:

Microbody-Profile nach 2 Tagen Kinetinbehandlung.

Bild 28:

Microbody-Profile nach 2 Tagen Belichtung und gleichzeitiger Kinetinbehandlung. (Die Microbodies zeigen häufig Invaginationen)

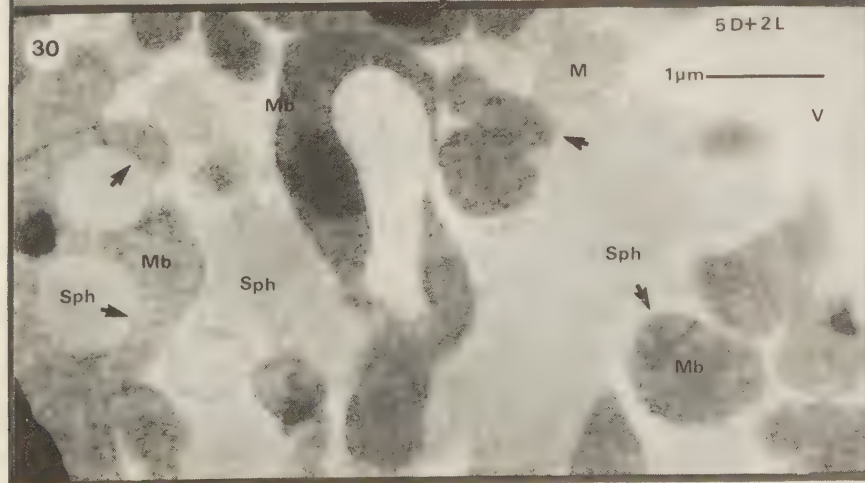
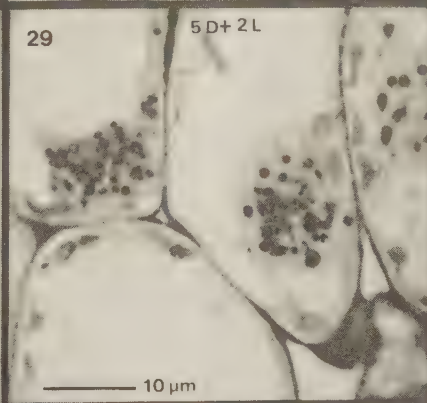
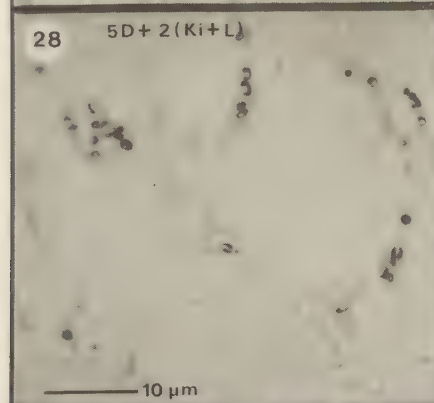
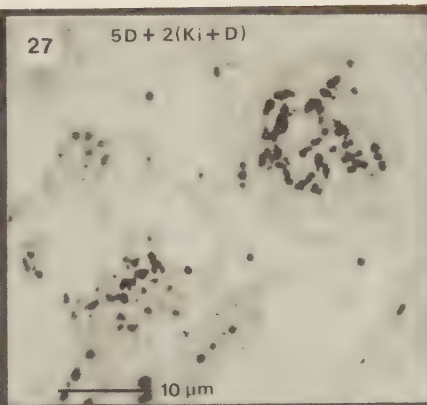
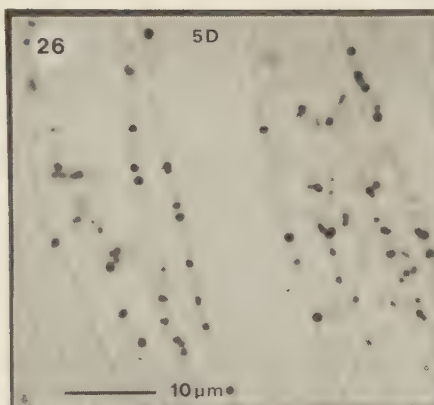
Bild 29:

"Traubenförmige" Microbodies nach 2 Tagen Belichtung.

Bild 30:

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Probe 29: die Microbodies haben hier engsten Kontakt mit den Sphärosomen und umhüllen sie teilweise (s.Pfeile).

Tafel IV



Tafel V

Bild 31:

Polyribosomen im Cytoplasma der Mesophyllzellen
4 Tage alter Sonnenblumenkeimlinge (3 Tage
etioliert + 1 Tag Belichtung und Cycloheximid-
behandlung)

Bild 32:

Kontrolle zu Präparat 31: Die Keimlinge wurden
24 Stunden ohne Cycloheximid belichtet. Poly-
ribosomen treten in deutlich geringerer Zahl
auf.

Bild 33:

Microbody (Peroxisom) aus der Mesophyllzelle
des Kotyledons eines 3 Tage alten etiolierten,
dann 48 Stunden belichteten Sonnenblumenkeimlings.
Die Microbody-Membran steht einerseits mit dem ER
und andererseits mit der Chloroplastenmembran in
Verbindung (Pfeile).

Bild 34:

Aufnahme des rauen ER in einem anderen Aus-
schnitt des in Bild 33 dargestellten Präparates:
Der dichte Besatz des ER mit Ribosomen zeigt,
daß die Ribosomen an der Membran mitfixiert
werden.

Bild 35:

Microbody mit einer Kontaktstelle zum ER (s.
Pfeil a), einem Sphärosom (s.Pfeil b) und einem
Chloroplasten (s.Pfeil c) im gleichen Präparat
wie in Bild 33.

Bild 36:

Verbindung eines Mitochondriums mit dem ER.
Das ER geht direkt in die äußere Mitochondrien-
membran über (vgl. Bilder 57 mit 63 von *Neuro-
spora crassa*). Diese Aufnahme ist ein anderer
Ausschnitt des Präparates für Bild 31.

Bild 37:

Verbindungsstelle des ER mit der äußeren Mem-
bran eines Chloroplasten (Präparat wie für
Bild 33).

Tafel V

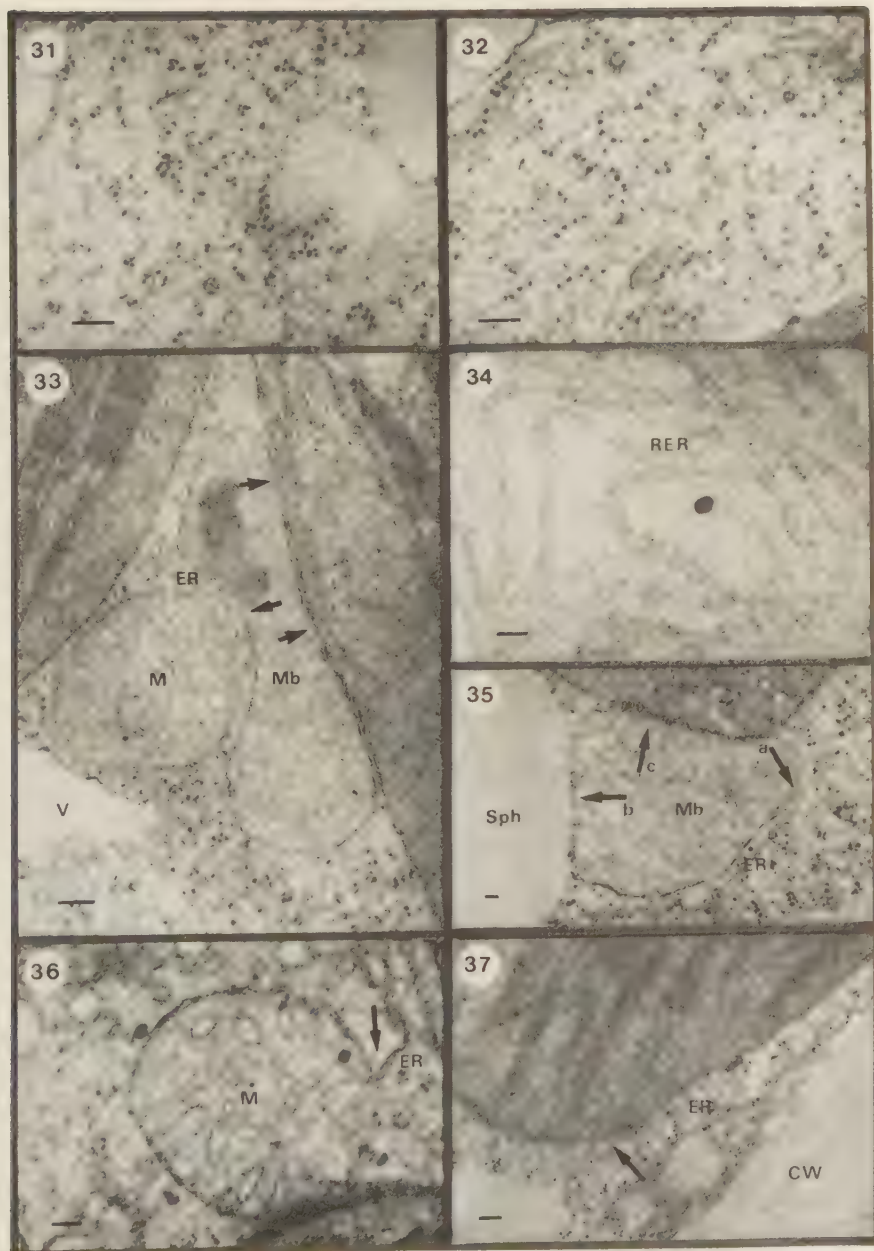


Bild 38:

Neurospora crassa "slime" Zellen aus einer Submerskultur in der frühen logarithmischen Wachstumsphase. Die Vermehrung erfolgt durch Querteilung bzw. Knospung (s.Pfeil).

Bild 39:

Zelle aus der logarithmischen Wachstumsphase mit cytoplasmatischer Ausstülpung ins Nährmedium (s.Pfeil).

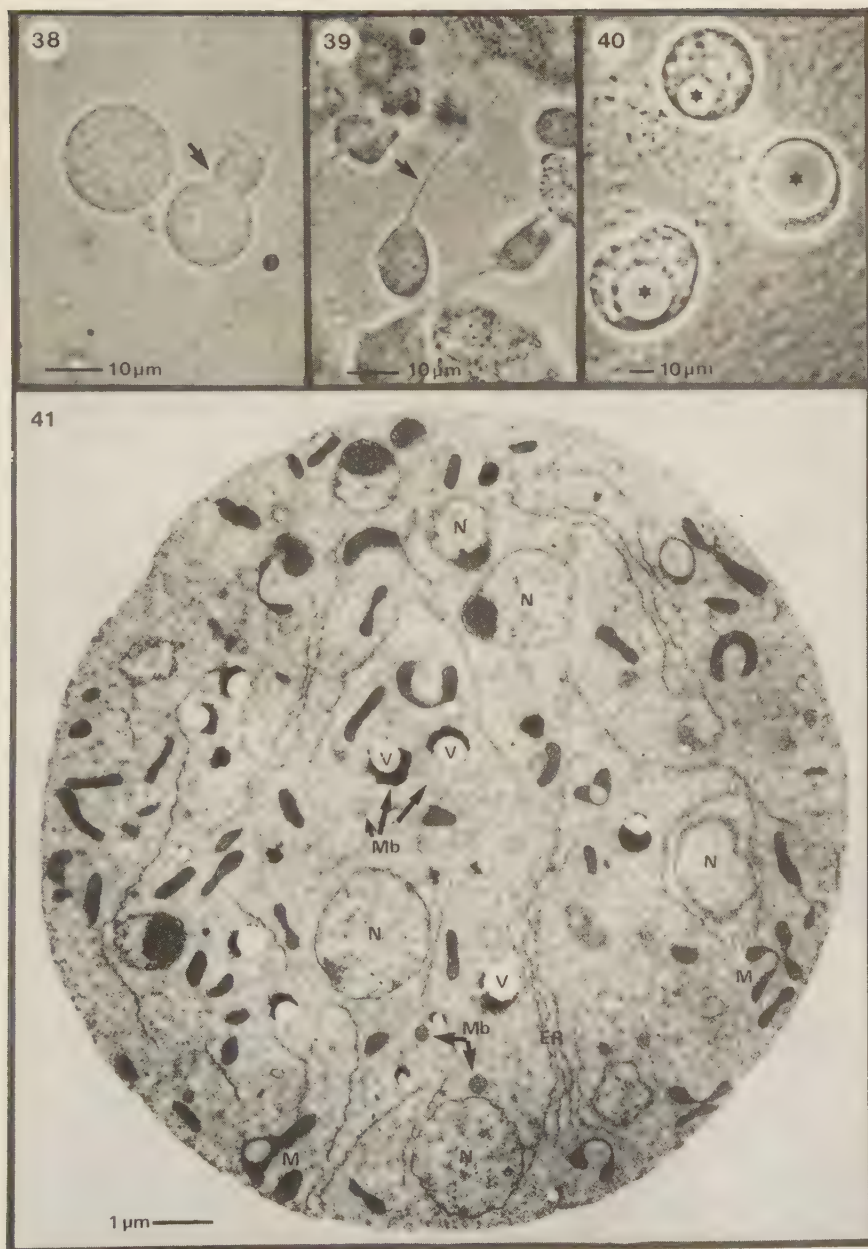
Bild 40:

Zellen aus der beginnenden stationären Wachstumsphase mit deutlich sichtbaren Vakuolen (s.Sternchen).

Bild 41:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes einer *Neurospora crassa* "slime" Zelle aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase. Das Präparat wurde mit Hilfe von DAB und H_2O_2 auf Katalaseaktivität cytochemisch untersucht: Nur in den hier sichelförmigen Microbodies vom Typ b ist das DAB-Reaktionsprodukt (als Schwarzfärbung) sichtbar (s.Pfeile Mb). Nicht-Katalase-haltige Microbodies vom Typ a sind ebenso wie die des Typ b gleichmäßig über den Zellquerschnitt verteilt (s.Pfeile Mb).

Tafel VI



Tafel VII

Bild 42:

5 Microbodies vom Typ a einer Zelle aus einer 24-stündigen Pilzkultur in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem ER-Strang. Trotz Inkubation des Präparates mit DAB und H_2O_2 ist Katalase cytochemisch nicht nachweisbar!

Bild 43:

4 Microbodies vom Typ b nach Behandlung einer Zelle einer 24-Stunden alten Pilzkultur mit DAB und H_2O_2 : Die deutliche Schwarz-"Färbung" der Organelle zeigt Katalase an.

Bild 44:

Ein Microbody vom Typ b nach Behandlung des Präparates mit DAB ohne H_2O_2 (Kontrolle): Das Organell zeigt keine H_2O_2 Schwarz-"Färbung", da das Substrat für die enzymatische Reaktion fehlt (Alter der Pilzkultur: 24 Stunden).

Bild 45:

Microbody vom Typ a mit einem hexagonalen Einschluß.

Bild 46:

Ein Microbody einer Zelle aus einer 24 Stunden alten Pilzkultur steht in engem Kontakt zu einer kleineren Vakuole. Die Microbody-Membran ist noch intakt.

Bild 47:

Präparat der gleichen Zellkultur wie für Bild 46, jedoch mit DAB und H_2O_2 inkubiert: Das durch Katalaseaktivität H_2O_2 deutlich schwarz "gefärbte" Organell umgibt eine Vakuole. Beide Organelle sind noch eindeutig von einer eigenen Membran umgeben.

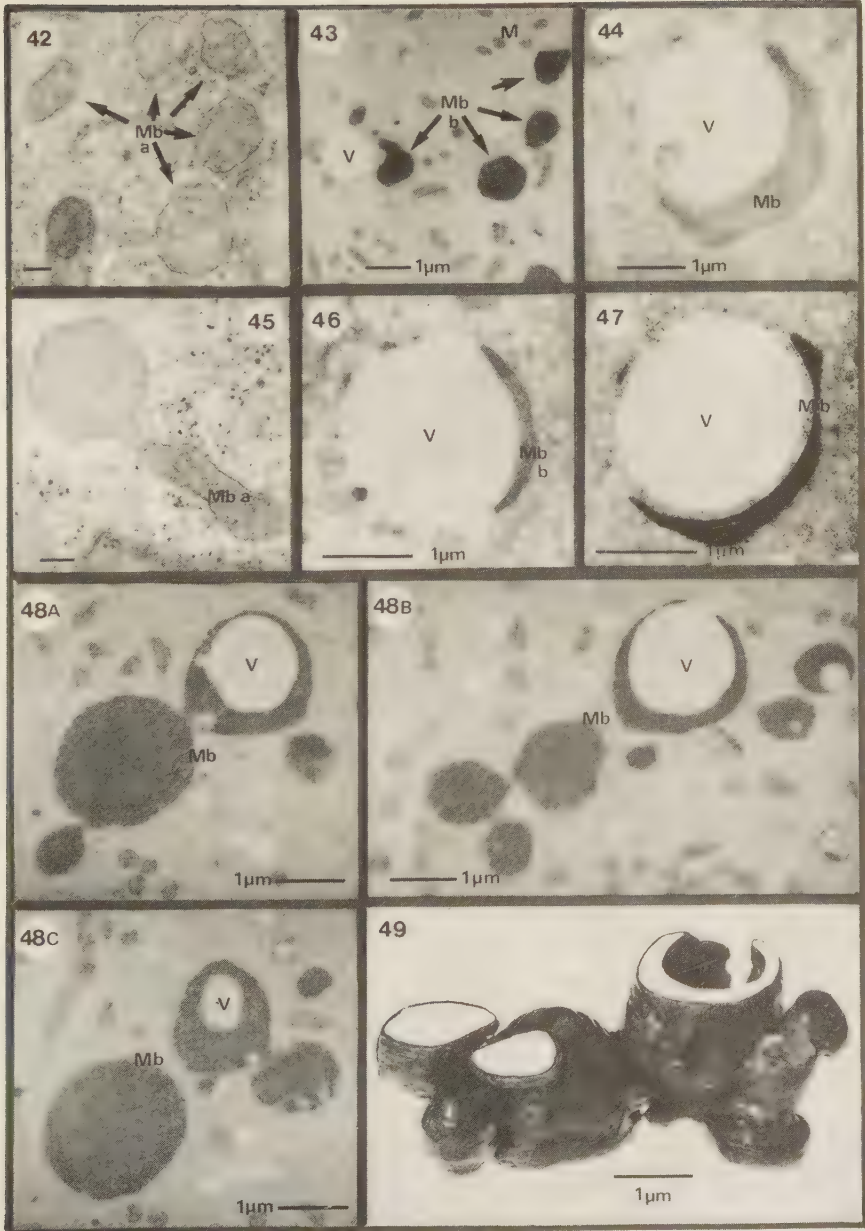
Bilder 48 A,B,C:

Typische Einzelaufnahmen aus einer Schnittserie zur dreidimensionalen Rekonstruktion eines Microbodies vom Typ b (Bild 48 C $\hat{=}$ Schnitt Nr. 1; Bild 48 A $\hat{=}$ Schnitt Nr. 5; Bild 48 B $\hat{=}$ Schnitt Nr. 12).

Bild 49:

Dreidimensionales Modell eines Teiles eines Microbodies vom Typ b, das durch maßstabgerechte Rekonstruktion aus 14 Serienschnitten geformt wurde. (Die weißen Flächen zeigen die Anschnittflächen an.)

Tafel VII



Tafel VIII

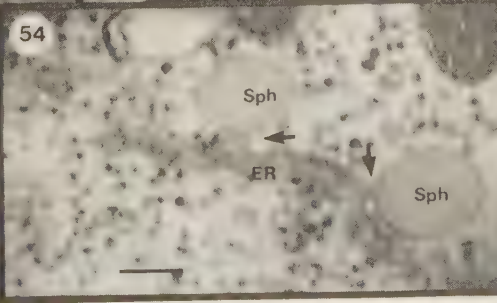
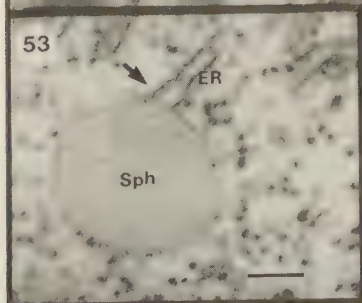
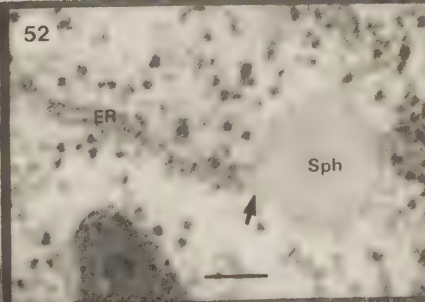
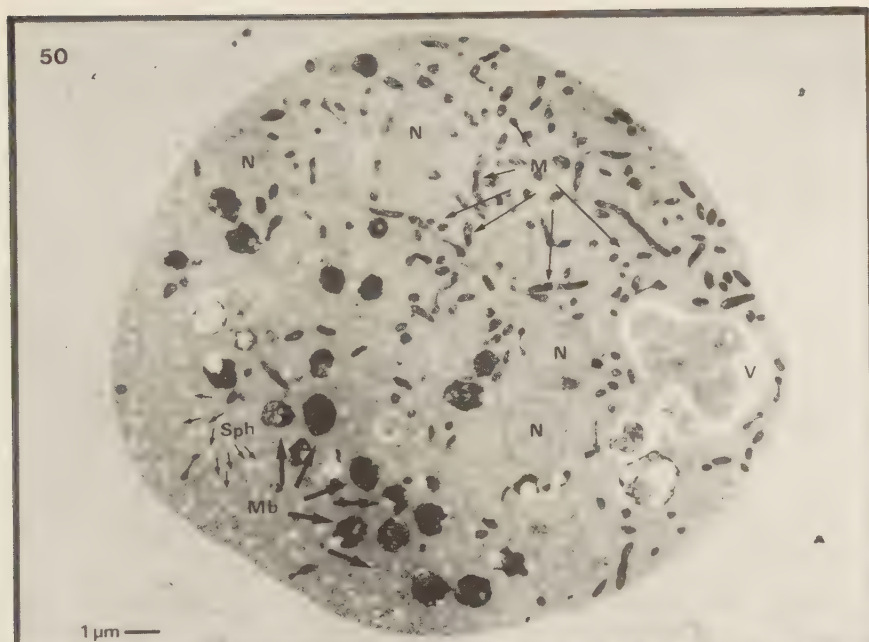
Bild 50:

Neurospora crassa "slime" Zelle aus einer 36 Stunden alten Pilzkultur. Für dieses Stadium sind längliche Mitochondrienprofile, größere Vakuolen, zahlreiche Sphärosomen, wenig ER und Profile von Microbodies (Typ b) mit auffallend großen Durchmessern typisch.

Bilder 51-54:

Kontakte von Sphärosomen mit ER-Strängen, die auf ihre Entstehung hinweisen könnten. Sie scheinen sich traubenförmig von einem verzweigten ER-Strang abzuschnüren (Bilder 51 und 54). Die Sphärosomenmembran geht direkt in den cytoplasmaseitigen, elektronendichten Teil der Elementarmembran des ER-Stranges über (Bild 52, s. Pfeil). Auch Sphärosomen mit kurzen Membranfortsätzen (Bild 53) finden sich in *Neurospora crassa* (vgl. dazu Bilder der Tafel I von Sphärosomen höherer Pflanzen).

Tafel VIII



Tafel IX

Bild 55:

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Microsomalfraktion von Zellen einer 20 Stunden alten *Neurospora crassa* "slime" Kultur. Die reichlich vorhandenen Membranen und Membranvesikel sind z.T. reichlich mit Ribosomen besetzt.

Bild 56:

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Microsomalfraktion von Zellen einer 46 Stunden alten *Neurospora crassa* "slime" Kultur. Diese Fraktion zeigt nur vereinzelt Membranvesikel, die z.T. mit Ribosomen besetzt sind (s.Pfeil).

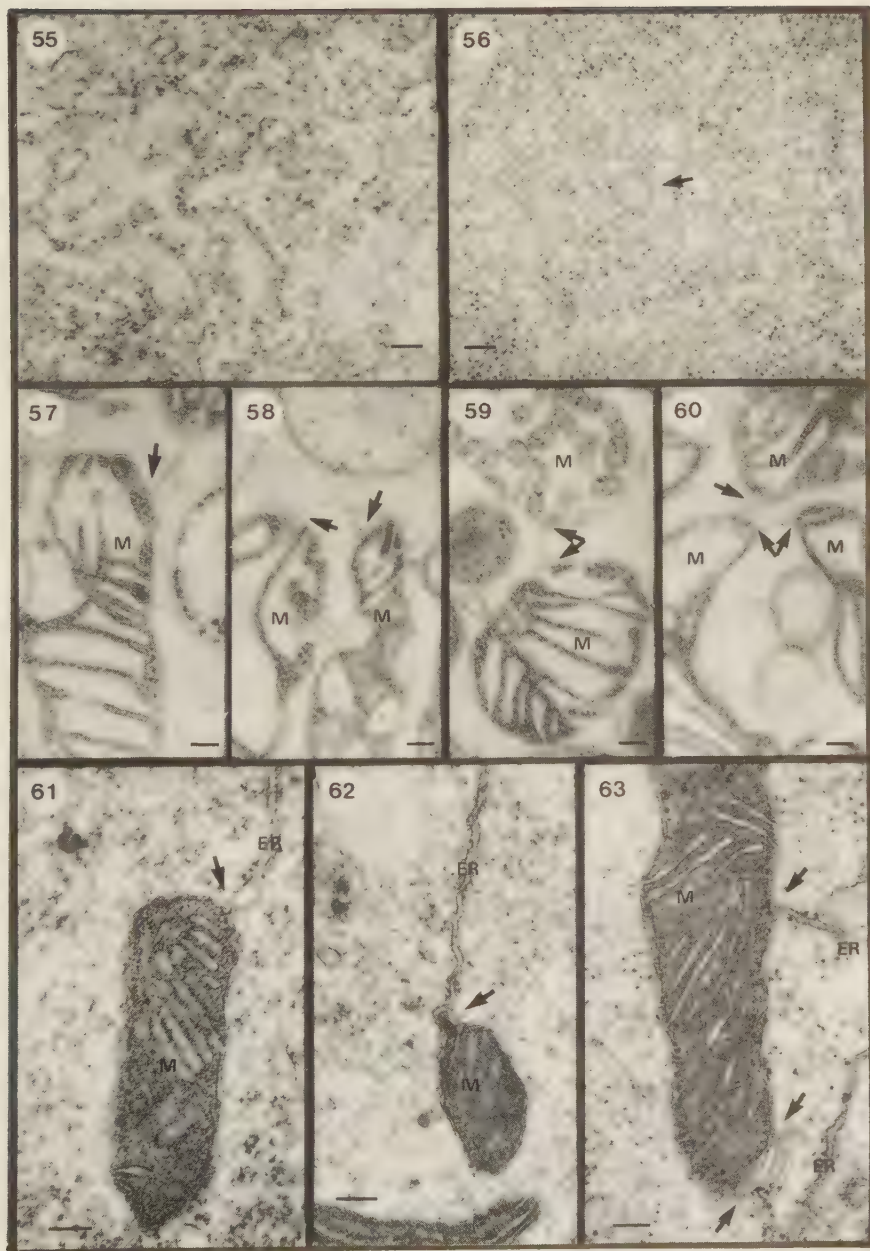
Bilder 57-60:

Mitochondrienprofile im elektronenmikroskopischen Präparat einer Rohpartikelfraktion von Zellen einer 20 Stunden alten *Neurospora crassa* "slime" Kultur. Die Mitochondrienaußenmembranen zeigen Membran-Fortsätze (Bilder 57 und 58, s.Pfeile). Die isolierten Mitochondrien können über derartige Fortsätze miteinander verbunden sein (Bilder 59 und 60, s.Pfeile).

Bilder 61-63:

Verbindungen des ER mit der äußeren Membran von Mitochondrien in situ, wie sie in Präparaten von *Neurospora crassa* "slime" Zellen einer 20 Stunden alten Pilzkultur auftreten.

Tafel IX



Tafel X

Bild 64:

Spiralenförmig angeordnete ER-Stränge im Präparat einer *Neurospora crassa* "slime" Zelle aus einer 16 Stunden alten Pilzkultur.

Bild 65:

Verbindung des ER mit der äußeren Kernmembran (dicker Pfeil). Die äußere Kernmembran und das ER sind stellenweise mit Ribosomen besetzt (kleine Pfeile).

Bilder 66 und 67:

Verbindung des ER mit Microbodies vom Typ a (dicke Pfeile). Das ER ist stellenweise mit Ribosomen besetzt (kleine Pfeile).

Bild 68:

Verbindung des ER mit einem Microbody vom Typ b in enger Nachbarschaft zu einer kleinen Vakuole.

Bild 69:

Direkter Übergang des Lumens eines ER-Stranges in das Lumen einer Vakuole (s.Pfeil).

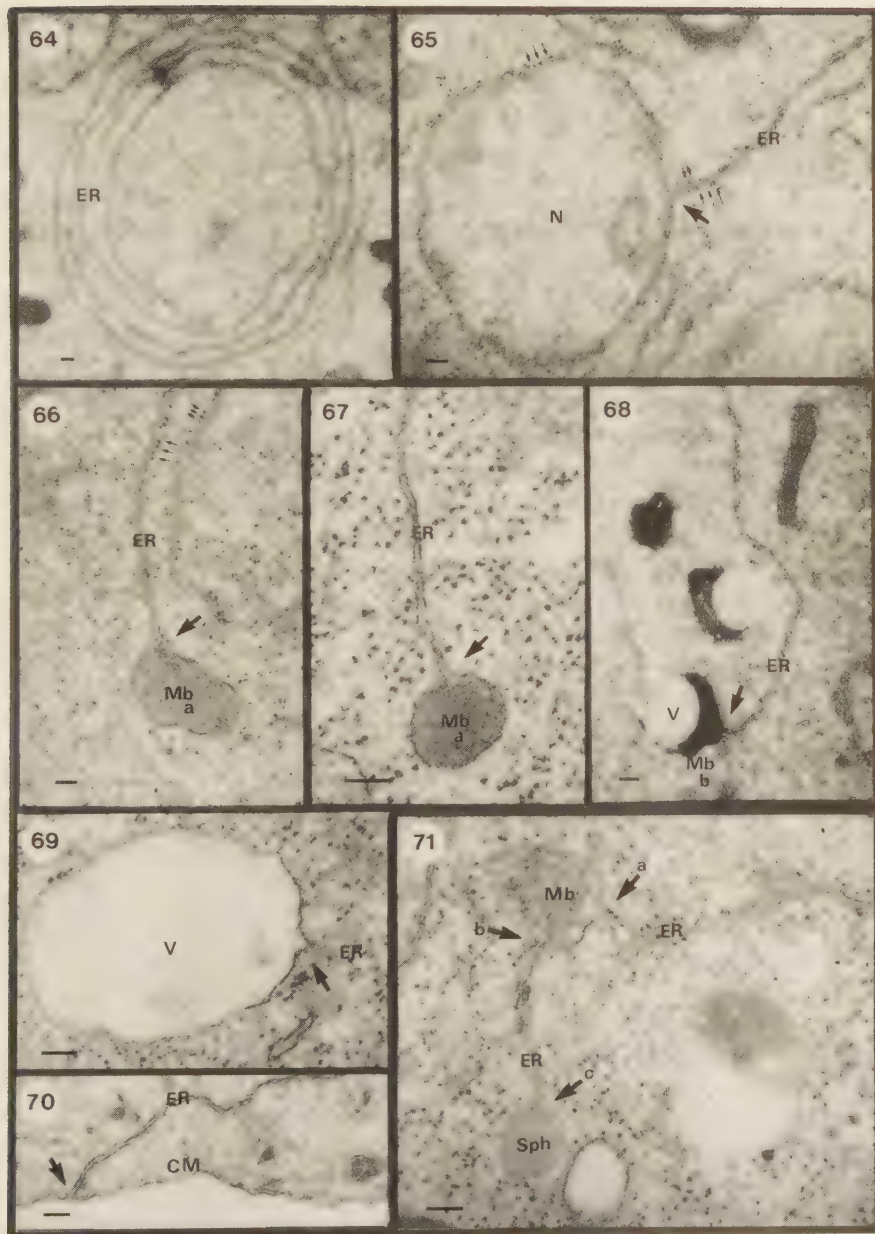
Bild 70:

Verbindung des ER mit der Cytoplasmamembran der "slime" Mutante.

Bild 71:

Verbindung eines Microbodies vom Typ a mit einem Sphärosom über einen ER-Strang (s.Pfeile a, b und c).

Tafel X



Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn
Professor Dr.R.R.Theimer für die Anregung
zu diesen Untersuchungen und die Beratung
während der Experimente herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. E.L.Vigil für
die anregenden Diskussionen und die "Tricks"
für die elektronenmikroskopische Präparation.

Herrn Dr. H.Formanek fühle ich mich für all
das, was ich durch ihn gelernt habe, ganz
besonders verbunden.

Außerdem danke ich allen kollegialen
Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Lebenslauf

- 1949: Geboren in München am 25. Juli.
- 1955 bis 1960: Volksschule in München
- 1960 bis 1969: Naturwissenschaftliches Gymnasium in München.
- 1969: Beginn des Biologiestudiums an der Universität München
- 1971: Vordiplomprüfung
- 1973: Diplomhauptprüfung
- 1973 bis 1974: Diplomarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer
- 1974: Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer

